

**A HLTF (*Helicase like transcription factor*) és az SHPRH (*SNF2
histone linker PHD RING helicase*) fehérjék szerepe a károsodott
DNS replikációjában**

Ph.D. értekezés

Írta: Hajdú Ildikó

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2009

1 Tartalomjegyzék

1	<u>TARTALOMJEGYZÉK</u>	- 2 -
2	<u>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</u>	- 4 -
3	<u>IRODALMI BEVEZETÉS</u>	- 6 -
3.1	A DNS-HIBAJAVÍTÁS	- 6 -
3.2	A DNS-HIBAJAVÍTÁS KUTATÁSÁNAK RÖVID TÖRTÉNETE	- 7 -
3.2.1	AZ ELSŐ DNS-HIBAJAVÍTÓ MECHANIZMUS FELFEDEZÉSE	- 7 -
3.2.2	A NUKLEOTIDKIVÁGÓ DNS-HIBAJAVÍTÁSI FOLYAMATOK FELFEDEZÉSE	- 7 -
3.2.3	A DNS-HIBAJAVÍTÁSI FOLYAMATOK ÉS A RÁKOS ELFAJULÁSOK KAPCSOLATA	- 9 -
3.2.4	A DNS KÁROSODÁSOKAT TOLERÁLÓ ÚTVONALAK FELFEDEZÉSE	- 10 -
3.2.4.1	MESELSON-STAHl KÍSÉRLET:	- 10 -
3.2.4.2	A KÁROSODOTT DNS REPLIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	- 11 -
3.2.4.3	A TRANSLÉZIÓS POLIMERÁZOK FELFEDEZÉSE	- 13 -
3.2.4.4	A TEMPLÁT VÁLTÁSSAL JÁRÓ FOLYAMATOKRA UTALÓ ELSŐ MEGFIGYELÉSEK	- 13 -
3.3	A DNS-KÁROSODÁS OKOZTA REPLIKÁCIÓS BLOKK FEOLDÁSÁNAK MÁRA KIALAKULT MODELLJE ÉS A KUTATÁSI TERÜLET AKTUÁLIS KÉRDÉSEI	- 14 -
3.4	A DNS HIBA ÁTÍRÁSBAN RÉSZTVEVŐ FEHÉRJÉK	- 17 -
3.4.1	UBIKVITIN	- 17 -
3.4.2	PCNA (<i>PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN</i>)	- 18 -
3.4.3	RAD6-RAD18 (<i>RADIATION SENSITIVITY PROTEIN 6-RADIATION SENSITIVITY PROTEIN 18</i>)	- 19 -
3.4.4	TRANSLÉZIÓS POLIMERÁZOK	- 19 -
3.4.5	MMS2-UBC13 (<i>METHYL METHANESULFONATE SENSITIVITY PROTEIN 2 UBIKVIN CARRIER PROTEIN 13</i>)	- 20 -
3.4.6	RAD5 (<i>RADIATION SENSITIVITY PROTEIN 5</i>)	- 20 -
3.5	A DNS HIBA TOLERANCIA ÚTVONALAK GENETIKÁJA ÉS BIOKÉMIÁJA	- 21 -
3.6	A PCNA MÁSODLAGOS MÓDOSÍTÁSAINAK SZEREPE A DDT FOLYAMATOKBAN	- 23 -
3.7	A DDT FOLYAMATOK KONZERVÁLTSÁGA EUKARIÓTÁKBAN	- 25 -
3.8	AZ EMBERI HLTF (<i>HELICASE LIKE TRANSCRIPTION FACTOR</i>) ÉS AZ SHPRH (<i>SNF2 HISTONE LINKER PHD RING HELICASE</i>) FEHÉRJÉK	- 26 -
4	<u>CÉLKITŰZÉSEK</u>	- 28 -
5	<u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	- 29 -
5.1	PLAZMIDOK	- 29 -
5.2	KOMPLEMENTÁCIÓS KÍSÉRLETEK	- 30 -
5.3	FEHÉRJÉK TISZTÍTÁSA	- 30 -
5.4	GST PULL-DOWN KÍSÉRLETEK	- 31 -
5.5	IN VITRO UBIKVITILÁCIÓ	- 32 -
5.6	KOIMMUNOPRECIPITÁCIÓ	- 32 -
5.7	IN VIVO UBIKVITILÁCIÓ	- 33 -

5.8	SEJTNYÉSZTÉS, TRANSZFEKCIÓ	- 33 -
5.9	DNS FIBER KÍSÉRLETEK	- 33 -
6	EREDMÉNYEK	- 35 -
6.1	AZ ÉLESZTŐ RAD5 FEHÉRJE STRUKTURÁLIS EMBERI MEGFELELŐINEK AZONOSÍTÁSA	- 35 -
6.2	A HLTf RÉSZLEGESEN MENEKÍTI AZ ÉLESZTŐ RAD5 DNS KÁROSÍTÓ HATÁSOKRA MUTATOTT ÉRZÉKENYSÉGÉT	- 38 -
6.3	A HLTf ÉS AZ SHPRH KÖLCSÖNHAT A RAD5 KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREINEK EMBERI MEGFELELŐIVEL	- 41 -
6.3.1	<i>IN VIVO</i> KOIMMUNOPRECIPITÁCIÓS KÍSÉRLETEK	- 41 -
6.3.2	<i>IN VITRO</i> FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSI KÍSÉRLETEK	- 43 -
6.4	A HLTf ÉS AZ SHPRH STIMULÁLJA A PCNA POLIUBIKVITILÁCIÓJÁT	- 45 -
6.4.1	A PCNA POLIUBIKVITILÁCIÓ STIMULÁLÁSÁNAK VIZSGÁLATA <i>IN VIVO</i> KÍSÉRLETI RENDSZERBEN	- 45 -
6.4.2	A PCNA POLIUBIKVITILÁCIÓ STIMULÁLÁSÁNAK VIZSGÁLATA <i>IN VITRO</i> KÍSÉRLETI RENDSZERBEN	- 47 -
6.5	A HLTf HATÁSA A KÁROSODOTT DNS REPLIKÁCIÓJÁRA	- 48 -
7	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	- 54 -
8	ÖSSZEFOGLALÁS	- 59 -
9	MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	- 60 -
10	SUMMARY OF THE PHD THESIS (ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ)	- 64 -
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 67 -
12	REFERENCIÁK	- 68 -

2 Rövidítések jegyzéke

ADH	alkohol dehidrogenáz
BER	bázis kivágó DNS hibajavítás
BJ5464	vakuoláris proteáz hiányos élesztő törzs
BrdU	Bromodeoxyuridine
CMV	citomegalovírus
DDT	DNA Damage Tolerance (DNS hiba tolerancia)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
E.coli	Escherichia coli
E1	ubiquitin aktiváló enzim
E2	ubiquitin konjugáló enzim
E3	ubiquitin ligáz enzim
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic-acid
EPR	enzymatic photoreactivation, enzimatis fotoreaktiváció
Flag	Flag epitóp tag
GAL	galaktóz
GST	gluthathion-S-transferase
H15	hisztin fehérjék 1-es és 5-ös családjára jellemző domén
HA	hemagglutinin epitóp tag
HIRAN	HIP116, Rad5p N-terminal domain
HLTF	helicase like transcription factor
HLTF siRNS	HLTF-et csendesítő siRNS
hMms2	emberi Mms2
HNPCC	Hereditary non-polyposis colon cancer, öröklődő nem polipózis vastagbél rák
hPCNA	emberi PCNA
hRad18	emberi Rad18
hUbc13	emberi Ubc13
ICL	interdomain connecting loop
IdU	Iodo-deoxyuridine
IP	immunprecipitáció, immunkicsapás
kDa	kilodalton
KR	kilo röntgen
MMR	mismatch DNS hibajavítás
MMS	metál-metán-szulfonát
Mms2	Methyl Methanesulfonate Sensitivity protein 2
NC siRNS	negatív kontroll siRNS
NEM	N-Ethyl-Maleinid
NER	nukleotid excíziós DNS hibajavítás
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigene
PGK	phosphoglycerate kinase
PHD	plan homeo domain

PMSF	phenyl-methane-sulphonyl-fluoride
PRR	posztreplikációs DNS hibajavítás
Rad18	Radiation sensitivity protein 18
Rad5	Radiation sensitivity protein 5
Rad6	Radiation sensitivity protein 6
recA	recombinase A
RFC	replication factor C
RING	really interesting new gene, ubikvitin ligáz domén elnevezése
RNS	ribonukleinsav
RTG	röntgen
RT-PCR	reverse polymerase chain reaction, reverz transzkripción alapuló polimeráz láncreakció
Sc.	Saccharomyces cerevisiae
SDS	sodium dodecyl sulfate
S-fázis	sejtciklus szintetikus fázisa
SHPRH	SHPRH- SNF2, histone-linker, PHD and RING finger domain-containing helicase
siRNS	small interfering RNS, kis interferencia RNS
Sp.	Shizosaccharomyces pombe
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable
TCL	transcription coupled repair, transzkripció kapcsolt DNS hibajavítás
TLS	translesion synthesis, transzléziós szintézis
TSL	teljes sejtlizátum
Uba1	ubiquitin-activating enzyme E1, ubikvitin aktiváló enzim
Ubc13	Ubiquitin carrier protein 13
USP1	deubiquitináló enzim
UV	ultraibolya, ibolyántúli
Vr	replikációs ráta, kilobázis/perc
WB	western blott
XP-V	Xeroderma pigmentosum variant

3 Irodalmi bevezetés

3.1 A DNS-hibajavítás

Az élőlények a szervezetük felépítéséhez és szabályozott működéséhez szükséges információkat az élővilágban egyetemesen, a genetikai kód révén, a DNS (*Dezoxiribonukleinsav*) molekulában tárolják. Kivételt képeznek az RNS vírusok¹, ahol a genetikai információ RNS-ben (*Ribonukleinsav*) kódolt. A DNS és az RNS kémiai szerkezete nagyon hasonló, azonban egy lényeges eltérés közöttük, hogy a DNS-t felépítő nukleotid egységekből hiányzik egy hidroxil csoport az RNS-t felépítőkhöz képest, így a DNS stabilabb, mint a RNS. A DNS nagyobb stabilitása lényegi szerepet játszhatott abban, hogy az ősi RNS világot követően az élőlények hosszabb távú információtárolásra tudtak berendezkedni. Ez a stabilitás azonban csak viszonylagos: A sejtekben az örökítő anyagot folyamatosan érik külső és belső forrásokból származó károsító hatások, amelyek a DNS kémiai szerkezetét megváltoztatják, mutációkat, genomikus instabilitást, illetve ennek következtében a sejtek halálát vagy rákos elfajulását okozhatják^{2,3,4}. Amennyiben az egészségünk megőrzéséről van szó, a DNS károsító hatások közül általában nagy hangsúlyt kapnak a környezeti ártalmak közül az ibolyántúli (*UV*, *Ultraviolet*) sugárzás, az RTG (*Röntgen*) sugárzás, az élelmiszerekkel a szervezetünkbe juttatott vegyszerek, a dohányfüst, vagy az autók kipufogó gázából a levegőbe jutó policiklusos aromás vegyületek. Azonban optimális környezeti felételek, illetve optimális életmód mellett is naponta több száz DNS-módosulás következik be egy átlagos sejt genomjában. Hogyan éljük túl ezeket? Miért nem okoznak ezen károsodások sejthalált vagy rákos elfajulásokat?

A választ a DNS-hibajavító rendszerek adják meg. Több, kiemelkedő hatékonyságú DNS-hibajavító mechanizmus működik még a legegyszerűbb baktériumban is. E rendszerek számos fehérje összehangolt működését igénylik, amelyek hiánya, vagy károsodása gyakran okoz sejthalált, korai öregedést, vagy a sejt tumoros elváltozásához vezet. Nyilvánvaló tehát, hogy a DNS-hibajavító rendszerek megértése alapvető az új gyógymódok kidolgozásához illetve a meglévők finomabbra hangolásához a rákterápia valamint a gerontológia terén.

3.2 A DNS-hibajavítás kutatásának rövid története

3.2.1 Az első DNS-hibajavító mechanizmus felfedezése

Az első DNS-hibajavító mechanizmus felfedezése Albert Kelner és Renato Dulbecco nevéhez köthető. Az 1940-es években, egymástól függetlenül megfigyelték az enzimatikus fotoreaktiváció (*enzymatic photoreactivation, EPR*) jelenségét. Az EPR során az UV fény hatására a DNS-ben kialakuló ciklobután-pirimidin-dimerek visszaalakulnak monomerekké egy látható fény indukálta folyamatnak köszönhetően. Albert Kelner olyan *Streptomyces griseus* mutánsokat szeretett volna izolálni UV sugárzás indukálta mutagenézissel, amelyek újabb, - az abban az időben egyetlen ismert antibiotikumnál - a penicillin-nél hatékonyabb antibiotikumot képesek előállítani. (Az UV sugárzást már abban az időben rutinszerűen használták mutációk izolálására mikroorganizmusokban.) Kelner, a kísérleti rendszere kalibrálása során *E.coli* (*Escherichia coli*) és *Streptomyces griseus* törzseket sugárzott be UV fénnel. Ismételt kísérletekben, a besugárzást követően a sejtek túlélése nagyon változó volt. Úgy gondolta, hogy a megismételhetetlen, nagy varianciát mutató eredmények oka a látható fény ⁵. Kimutatta, hogy ha az UV fénnel való besugárzás után a lemezeket látható fénynek teszi ki, jóval nagyobb mennyiségű sejt éli túl az UV kezelést. Ezzel párhuzamosan, Renato Dulbecco fág gének funkciójának vizsgálatához használt ibolyántúli fényt. Ha azokat a lemezeit, amelyeken UV kezelt fágokkal fertőzött baktériumok voltak egymás tetejére téve a laboratóriumi munkaasztalán hagyta, a túlélő fágok száma nagymértékű varianciát mutatott. Észrevette, hogy azokon a lemezeken, amelyek felül helyezkedtek el, a látható fénynek jobban kitéve, jóval több fág élte túl az UV kezelést, mint azokon, amelyek a sorban alul voltak. Dulbecco arra következtetett, hogy létezik egy olyan DNS hibajavító rendszer, amelyet a látható fény indukál ⁶. Később ezt a DNS-hibajavító folyamatot fotoreaktivációnak nevezték el ⁷.

Kelner és Dulbecco megfigyelései elsőként bizonyították a DNS-hibajavítás jelenségének létét.

3.2.2 A nukleotidkivágó DNS-hibajavítási folyamatok felfedezése

A sérült nukleotid kivágásán alapuló DNS-hibajavítási folyamatok (*Nucleotide Excision Repair, NER*) lényege, hogy a károsodott bázisokat is tartalmazó, rövidebb DNS szakaszt egy endonukleáz eltávolítja a DNS szálból, majd az eltávolított nukleotidok helye feltöltésre kerül,

amely feltöltéshez a nem károsodott szál szolgál templátként. Ezt a DNS szintézist „DNS javító” szintézisnek is nevezik.

Az 1950-es évek végén több, egymástól független kutatócsoport is beszámolt arról, hogy ha baktérium sejteket UV sugárral kezeltek és a lemezelés előtt hosszabb ideig tápoldatban tartották, jóval több sejt élte túl a kezelést mintha közvetlenül a kezelés után kerültek volna lemezre. E hatás a látható fénytől független, így arra engedte következtetni a kor kutatóit, hogy egy, az EPR-től független DNS-hibajavítás is működik baktériumokban ⁸. Az 1960-as évek közepén Paul Howard Flanders, Richard Boyce, Richard Setlow és Paul Swenson egymástól függetlenül megfigyelték, hogy UV besugárzás után az *E.coli* rövid DNS darabokat, amelyek az UV indukálta léziókat is tartalmazzák, eltávolítja a genomjából ^{9,10}. Emellett Howard Flanders izolált három olyan UV érzékeny *E.coli* törzset, amelyek ebben a folyamatban mutánsok voltak (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*) ¹¹. E mutációkat térképezve azt találták, hogy az UV érzékenyséért felelős gének az *E.coli* kromoszóma különböző régiójában helyezkednek el, így arra következtettek, hogy a nukleotid kivágó mechanizmusért több gén terméke felelős. Körülbelül ugyanebben az időszakban Philip Hanawalt az UV fény DNS replikációjára gyakorolt hatását vizsgálva megfigyelte, hogy a nukleotid kivágásával párhuzamosan DNS szintézis is történik. E szintézist nevezték később a már említett DNS javító szintézisnek ¹². Ezen tanulmányok eredményeként kialakult a NER fentebb bemutatott modellje ⁸. Az UV indukálta DNS károsodások nukleotid kivágáson alapuló javításának megléte emlős sejtekben is leírásra került, körülbelül egy időben az *E.coli* tanulmányokkal ¹³.

A következő évtizedben egyre inkább nyilvánvalóvá vált, hogy többféle nukleotid kivágáson alapuló DNS-hibajavítás létezik. Thomas Lindhal és munkatársai a DNS-be hibásan beépített uracil javítását vizsgálva megfigyelték, hogy a pirimidin dimerek javításával ellentétben (ahol kisebb, a DNS hibát is tartalmazó DNS szakaszok kerülnek kivágásra), az uracil egyetlen bázisként kerül eltávolításra a genomból egy speciális enzim, az uracil glükoziláz segítségével ¹⁴. Ezen felfedezés elvezetett a bázis kivágó DNS-hibajavítás (*Base Excision Repair*, BER) és a nukleotid kivágó DNS-hibajavítás (*Nucleotide Excision Repair*, NER) megkülönböztetéséhez.

Az 1970-es években tehát világossá vált, hogy a sejtekben több DNS hibajavító mechanizmus működik egymással párhuzamosan, akár ugyanazon DNS hiba eltávolítására is.

3.2.3 A DNS-hibajavítási folyamatok és a rákos elfajulások kapcsolata

James Cleaver és Bob Painter, fokozott bőrrák kockázattal jellemzett, XP (*Xeroderma Pigmentosum*) betegek bőréből származó sejteket tenyésztettek, majd a nukleotid kivágó DNS-hibajavításra jellemző, UV sugárzás indukálta, DNS javító szintézis meglétét vizsgálták. Megfigyelték, hogy a NER-re jellemző DNS javító szintézis nem működik ezekben a sejtekben¹⁵. Ez volt az első olyan eredmény, amely felhívta a figyelmet a DNS integritás megőrzésének fontosságára, illetve a DNS-hibajavítás szerepére a rák kialakulásában.

A DNS-hibajavító folyamatok rákos elfajulásokban való szerepét egy másik, a replikáció során rosszul párosodott bázisok javításában szerepet betöltő hibajavító folyamat megismerése is megerősítette. A DNS megkettőzése folyamán előfordul, hogy nem a bázispárosodás szabályainak megfelelő nukleotid kerül beépítésre. Amennyiben ezek a rosszul párosodott bázisok (mismatch-ek) nem kerülnek javításra, mutációk kialakulását eredményezhetik. Ezen hibák javítása speciális, hiszen a javító folyamat során kulcsfontosságú a régi (ami a rosszul párosodott nukleotid párból a helyeset tartalmazza) és az újonnan szintetizálódott DNS szál megkülönböztetése. Matthew Meselson felfedezése szerint *E.coli*-ban a szálmegkülönböztetés alapja, hogy a szülői szálban a GATC szekvenciák mentén az adenin metilált formában fordul elő¹⁶. Paul Modrich és munkatársai írták le később az ezen metiláción alapuló, a DNS szálmegkülönböztetést magában foglaló, hibás bázispárosodások javítására specializálódott DNS-hibajavítási folyamatot, amelyet *Mismatch Repair* (MMR)-nek nevezték el¹⁷. Később Richard Kolodner, Modrich és Bert Vogelstein munkássága rámutatott, hogy az öröklődő, úgynevezett „nem polipózis vastagbél rák”-ban (*Hereditary non-polyposis colon cancer*, HNPCC) szenvedő betegekben az MMR folyamatok nem működnek^{18,19,20}.

E két, a rák kialakulásával kapcsolatba hozható DNS-hibajavító folyamat mellett Philip Hanawalt és munkatársai leírtak egy ugyancsak a nukleotidok kivágásán alapuló javítási folyamatot, amely a transzkripció közben működik. E mechanizmust transzkripció kapcsolt DNS-hibajavításnak (*Transcription coupled repair*, TCR) nevezték el^{21,22}. E hibajavító útvonalról is néhány év múlva kiderült, hogy a korai öregedéssel, rákra való erős hajlammal járó betegséghez, a Cockayne szindrómához köthető. E betegekben a TCR valamely részvevő fehérjéje nem működik^{23,8}.

3.2.4 A DNS károsodásokat toleráló útvonalak felfedezése

Az előzőek során ismertetett, élő rendszerekben megfigyelt hibajavító utakat *in vitro* is rekonstruálni lehetett rekombináns komponensek felhasználásával^{24,25,8}. Ezen folyamatok közös jellemzője, hogy a hibajavítás eredményeként a hiba, ha azt a kémiai szerkezet és a DNS információ tartalmának megváltozásaként értelmezzük, megszűnik és az eredeti állapot helyreáll.

A DNS hibák felismerése és javítása azonban nem tökéletes, az előbbieken ismertetett DNS-hibajavító rendszerek sokszor nem elég hatékonyak ahhoz, hogy az összes léziót eltávolítsák. Emellett, a DNS meghibásodása egy véletlenszerű, időben nem szabályozott esemény, így fennáll annak a lehetősége, hogy a DNS metabolizmus folyamatai (transzkripció, rekombináció, replikáció) károsodott DNS-en történjenek. Amennyiben a replikáció károsodott DNS-en zajlik, annak veszélyes következményei lehetnek. Ha a replikációs apparátus rendkívüli templát hűsége okán nem képes a négy bázis egyikeként sem interpretálni a károsodást, akkor a DNS szintézise a károsodásnál leáll^{26,27}. Egyetlen ilyen hiba leállíthatja a replikációt illetve a sejtciklust és a sejt halálához, vagy a genom nagymértékű átrendeződéséhez, instabilitásához vezet. Ez utóbbi eukariótákban közvetlen kapcsolatba hozható a karcinogenezissel. A megállt replikáció okozta genomikus instabilitás elkerülése érdekében kialakultak olyan folyamatok, amelyek átsegítik a replikációs apparátust a léziókon, biztosítják a replikáció folyamatosságát, azonban a DNS hibát nem távolítják el. Ezen mechanizmusokat DNS károsodás toleráló folyamatoknak hívjuk (*DNA damage tolerance*, DDT)²⁸.

A DNS hiba tolerancia útvonalak felfedezéséhez majd későbbi tanulmányozásához illetve megértéséhez elkerülhetetlen két, egymásra épülő, alapvető kísérleti rendszer ismerete.

3.2.4.1 Meselson-Stahl kísérlet:

A DNS megkettőzés mechanizmusának vizsgálatára Meselson és Stahl kidolgozott egy módszert, amellyel megkülönböztethető a szülői molekula a replikáció utáni molekulától. A kísérlet alapja, hogy az a DNS molekula, amelyben az egyik nukleotid helyére egy nukleotid analógot (5-bróm uracil-t) építenek be, sűrűség alapján megkülönböztethető a nukleotid analóggal nem jelölt molekulától. A kísérletet később Meselson és Stahl az eredeti ötlethez képest még annyiban módosította, hogy tekintve a 5-bróm uracil toxicitását, helyette a nitrogén 15-ös tömegszámú izotópját használták jelölésre. A kísérlet során több generáción keresztül

tenyésztettek *Escherichia coli*-t olyan táptalajon, ami nitrogénforrásként kizárólag $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -t tartalmazott. Az ilyen sejtekből származó DNS cézium-klorid grádiensen egy „nehéz” sűrűségű molekulaként ülepedik. Ez a sáv jól megkülönböztethető attól a sávtól, amelyet a $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ („könnyű”) tartalmú táptalajon növesztett baktérium DNS-e foglal el a sűrűség grádiensen. Meselson és Stahl az először ^{15}N -tömegszámú nitrogénen tartott sejteket elkezdte ^{14}N -tömegszámú nitrogént tartalmazó tápfolyadékban növeszteni. A kísérlet időtartama alatt folyamatosan mintákat vettek a kultúrából és tesztelték a DNS sűrűségét. Kezdetben egyetlen sávot figyeltek meg, a „nehéz” pozícióban. A kísérlet előrehaladtával egy másik sáv is kezdett megjelenni a könnyű és a nehéz sáv között. Párhuzamosan a nehéz sáv pontosan úgy kezdett el eltűnni, ahogy a hibrid sáv megjelent. Egy osztódás elteltével csak a hibrid, átmeneti sűrűségű sáv volt megfigyelhető. Ezt követően megjelent a könnyű DNS, és a második generációra a hibrid sűrűségű DNS mennyisége megegyezett a nem jelölt DNS mennyiségével. Meselson és Stahl következtetése a fenti kísérlet alapján az volt, hogy a DNS replikációja szemikonzervatív és nem pedig konzervatív, azaz a replikáció során a kettős szálú DNS szálai elválnak egymástól és a régi szál mentén új DNS szál szintetizálódik. Az így keletkezett kettős szálú DNS molekula egyik lánc a régi, modellül vagy templátként szolgáló lánc, míg a másik az újonnan szintetizálódott lánc.

3.2.4.2 A károsodott DNS replikációjának vizsgálata

Az UV sugárzás *in vitro* és *in vivo* egyaránt gátolja a DNS szintézisét. A replikációs blokk feloldása után újra növekvő DNS szálakat, méretük alapján el lehet választani. A cézium klorid sűrűség grádiens azonban erre nem alkalmas módszer. Nem nyújt információt a vizsgált DNS méretéről, csak a sűrűségéről, illetve nem szolgál információval a DNS folytonosságáról sem. (A szintetizálódó szálon a folytonossági hiány nem egyértelmű akkor, ha az a komplementer szállal duplexet képez.) A replikáció vizsgálata alkalikus szukróz grádiensen tette lehetővé ezen kísérleti korlátok átlépését. Alkalikus kondíciók között a DNS két szála denaturálódik, és amennyiben a centrifugálás időtartama kellően rövid, akkor a molekulákat sűrűség és méret szerint is el lehet választani. Tovább lépés a korábbi kísérleti elrendezésekhez képest, hogy ha a vizsgálni kívánt sejteket a grádiens tetején lizálják és *in situ* eltávolítják a

fehérjéket a DNS-ről, akkor a DNS nem törik el, így hiteles információ nyerhető a replikálódó DNS hosszáról ²⁹.

A károsodott DNS replikációjának ilyen felbontású vizsgálatát végezte Rupp és Paul Howard-Flanders az 1960-as évek végén. Olyan *E. coli* törzset használtak, amelyekben nem működött a NER ³⁰. E törzs használata megkönnyítheti az UV károsodás következményeinek vizsgálatát a replikációra azzal, hogy a károsodás nem kerül javításra a vizsgálat során, pontosabban a replikáció előtt. Megfigyelték, hogy a NER hiányában a baktérium törzs kromoszómájának mérete UV kezelés nélkül, alkalikus szukróz grádiensen vizsgálva körülbelül 15-20 százaléka a teljes kromoszóma méretének. Ez kromoszómánként 4-5 törésre utal, ami a kíméletes DNS preparálás során is előfordul. Az UV kezelés után szintetizálódó DNS azonban sokkal kisebb darabokként ülepedett, fragmentálódott. Ezen fragmentek közül még a legkisebbek mérete is majdnem tízszer nagyobb volt mint az Okazaki fragmentumoké, így azokkal nem volt összetéveszthető ³⁰. További vizsgálatok tisztázták a folytonossági hiány fizikai természetét, miszerint az újonnan szintetizálódó DNS szálak között nem replikálódott hézagok, rések találhatók. Az ilyen rések mérete körülbelül 1000-1600 nukleotid, és előfordulásuk megegyezik a pirimidin dimerek eloszlásával ³¹. E kísérletek igazolták, hogy a DNS károsodás valóban fizikai gátja a replikáció előrehaladásának.

Bryn Bridges és Evelyn Witkin később fevetették, hogy a Rupp és Howard-Flanders által javasolt úgynevezett posztreplikációs rések, hézagok az UV indukálta mutációk kialakulásának a helyei lehetnek ³². Közben Miroslav Radman felállított egy hipotézist, amelyben próbálta szintetizálni azokat a megfigyeléseket, amelyek az *E.coli*-ban azonosított, recA-tól és a lexA-tól függő DNS-hibajavító útvonalra vonatkoztak ⁸. Radman szerint az *E.coli*-ban a recA-tól és a lexA-tól függő DNS-hibajavítási útvonal fiziológiás körülmények között gátlás alatt van, de a DNS károsodások indukálják. Így ezt az útvonalat „SOS DNS-hibajavítás”-nak nevezte. Véleménye szerint, az a jel, amire az SOS válasz beindul, a megállt replikáció. Az SOS DNS-hibajavító rendszer mutagén DNS hibajavítást végez, így feltételezte, hogy a mutagenézis csak egy másodlagos következménye azoknak a kondícióknak, amelyekben SOS folyamatok működnek ³³. Később Bridges és Witkin megfigyelte, hogy az UV indukált mutációk száma nagymértékben lecsökken, az SOS válaszban mutáns *E.coli* törzsekben anélkül, hogy a posztreplikációs hézagok javítása sérülne. Így, továbbgondolva az korábban említett felvetésüket arra a következtetésre jutottak, hogy a replikáció során két, különböző mechanizmus segíti a

replikáció folytonosságának fenntartást. Az egyik mutagén, míg a másik mutáció mentes átírást biztosít ³⁴.

3.2.4.3 A transzléziós polimerázok felfedezése

Harrison és Hatch az 1970-es évek végén olyan mutációk keresése során, amelyek mellett a DNS károsodás indukálta mutagenézis nem működik, izoláltak két gént, az umuC-t és umuD-t. E gének mutációs elrontása következtében megszűnt a DNS károsodás indukálta mutagenézis. Úgy gondolták, hogy a UmuC és UmuD fehérjék úgymond feloldják a replikatív polimeráz szigorú hűségét, átsegítik a léziót tartalmazó szakaszon, így segítve a károsodott DNS replikációját ^{35,36,37}. Kísérletileg megfigyelték, hogy *in vitro*, mindkét fehérje elősegíti a replikatív polimeráz lézió történő áthaladását, a transzléziós szintézist (*translesion synthesis*, *TLS*). Később, kifinomultabb kísérleti rendszerek segítségével megállapították, hogy a TLS megtörténik UmuC egyedüli jelenlétében is, a replikatív polimeráz nélkül. Ezt követően hamar bebizonyosodott, hogy a UmuC önmaga is egy DNS polimeráz ^{38,39}. Ezzel párhuzamosan az is felismerésre került, hogy az *E.coli* dinB génje, amely a spontán mutagenézisben játszik szerepet, olyan fehérjét kódol, amely strukturális homológja UmuC-nek és önmaga is egy DNS polimeráz ⁴⁰.

Az 1990-es évek végére kiderült, hogy az *E.coli* UmuC és DinB fehérjék egy nagyobb polimeráz család, az Y család tagjai. Nyilvánvalóvá vált, hogy a sejtekben létezik egy különleges, specializált DNS polimeráz család, a transzléziós polimerázoké, amelyek fő funkciója a károsodott DNS replikációjának elősegítése ⁴¹.

3.2.4.4 A templát váltással járó folyamatokra utaló első megfigyelések

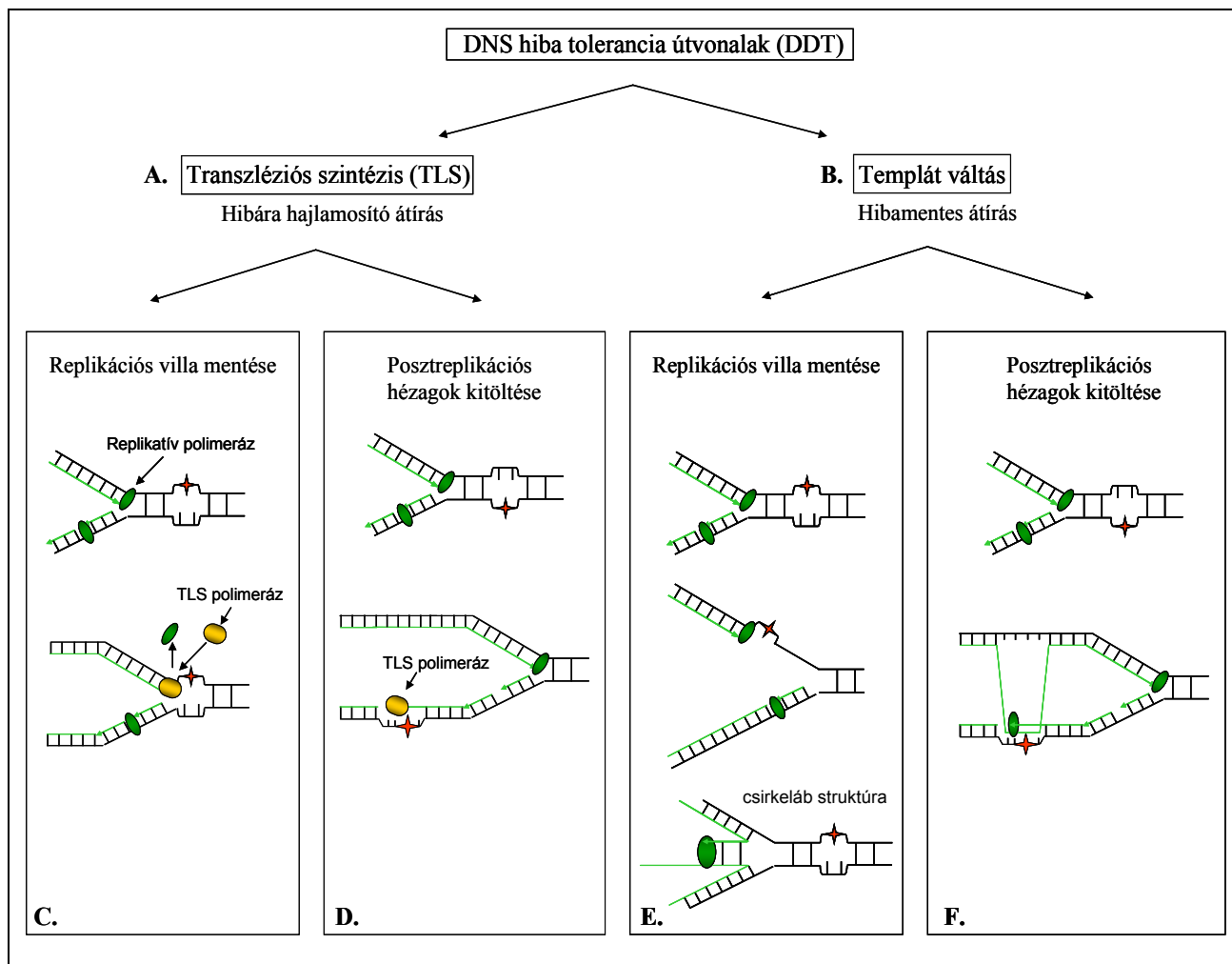
1976-ban két kutatócsoport egymástól függetlenül megvizsgálta, hogy miként viselkedik emlős sejtek károsodott DNS-e egyensúlyi cézium-klorid sűrűség grádiensen ^{42,43}. A kísérleti elrendezés lényegében a Meselson-Stahl kísérlethez hasonló, azzal a különbséggel, hogy radioaktívan jelölt halogenizált nukleotidot használtak a replikáció jelölésére. Alkiláló szerrel történő kezelés után azonosítható volt a normális replikációra jellemző hibrid sáv. Jól láthatóan azonosítható volt továbbá egy sáv, amelynek a sűrűsége „könnyű” volt. Ez a sáv bizonyosan nem annak a következménye volt, hogy a jelölés időtartama alatt a sejtek két S-fázison is

átmentek, ezért az egyértelműen konzervatív DNS szintézisre utalt ^{42,43}. A konzervatív DNS szintézis jelenségének magyarázatára a replikációs villa megfordításának a modelljét hívták életre. Eszerint, amennyiben a DNS szintézis vezető szála (*leading strand*) DNS károsodással találkozott, az a további szintézist megakadályozza, de nincs hatással a komplementer szál szintézisére, így az tovább folytatódik. Ezt követően a lemaradó szál (*lagging strand*) elválhat a szülői száltól, elválhat a blokkolt vezető szál is, és egymással párosodnak. Az így kialakult szerkezet leginkább egy csirke lábára emlékeztet, így a “csirkeláb-struktúra” (*chicken-foot structure*) (1. ábra, E panel, legalsó rajz) elnevezés meg is honosodott a szakirodalomban. Ezt követően a blokkolt vezető szál a lemaradó szálakat használja templátként annak a szekvenciának a szintézisére, amely szekvencia eredetileg a károsodás után helyezkedett el. Itt a DNS szintézise során templátként az újonnan szintetizált lánc kerül felhasználásra. Ha ez a szerkezet eltörik, akkor a “csirkeláb” középső ujja megfigyelhető lesz a sűrűség grádiensen. Ez volt a magyarázat a „könnyű” sáv megfigyelésére. A folyamat végén a “csirkeláb” mozgásával a replikációs villa helyreáll és a károsodás átírásra kerül. A “csirkeláb” szerkezetet elektronmikroszkóppal is azonosítani lehetett, középső ujja a mérések szerint akár 4000 bázispárt is kitehet ⁴³.

Érdemes megjegyezni, hogy a megfigyelt sűrűségű sáv létrejöttét egy másik mechanizmus is magyarázhatja. UV kezelés hatására az *E. coli* genom a már említett Rupp és Howard-Flanders megfigyelés szerint fragmentálódik, az újonnan szintetizálódó DNS szálak között nem replikálódott hézagok, rések alakulnak ki ³⁰. Ezen rések betöltése történhet egy rekombináció szerű folyamattal, ahol a két újonnan szintetizálódott szál összeolvad (1. ábra, F), lehetőséget adva a rés betöltésére az újonnan szintetizálódott sértetlen szál felhasználásával. A két, újonnan szintetizálódott szál összeolvadása magyarázhatja a megfigyelt sűrűségű sávot.

3.3 A DNS-károsodás okozta replikációs blokk feloldásának mára kialakult modellje és a kutatási terület aktuális kérdései

A sejtciklus szintetikus fázisa alatt tehát az úgynevezett DNS-károsodás toleráló (*DNA Damage Tolerance*, DDT) mechanizmusok biztosítják a DNS-károsodás következtében megállt replikációs villák mentését ^{28,44}.



1. ábra: DNS-károsodás tolerancia folyamatok ismert útvonalai

Zöld ovális: replikatív polimeráz, sárga ovális: transzléziós polimeráz, piros csillag: károsodott bázis, zöld vonal: újonnan szintetizálódott DNS szál, fekete vonal: eredeti templát szál

E folyamatok célja nem a DNS hibák eltávolítása, hanem a replikáció folyamatosságának illetve befejezésének biztosítása a sérült bázisok jelenlétében is, védve a sejtet a befejezetlen replikáció veszélyes következményeitől.

Ha a ma elfogadott, a DNS károsodások tolerálására felállított hipotéziseket összegezzük, a következő modellt állíthatjuk fel: A DDT útvonalak alapvetően két különböző DNS hiba átírási stratégiát jelentenek. A károsodott DNS szakaszon a replikáció vagy egy templát vagy egy polimeráz csere segítségével történik ^{28,45} (1. ábra, A, B). A DNS károsodást toleráló útvonalak az S fázis két, különböző pontján segíthetik a DNS hibák okozta replikációs problémák

feloldását. Részt vehetnek a DNS szintézise folyamán megakadt replikációs villák azonnali mentésében (1. ábra, C, E), illetve az S fázis végére a DNS hibákkal szemben kialakult, a Rupp és Howard-Flanders által megfigyelt ³⁰ úgynevezett „posztreplikációs hézagok” betöltésében (1. ábra, D, F). Mind a replikációs villa közvetlen mentése, mind a posztreplikációs hézagok betöltése vagy polimeráz, vagy templát csere segítségével történhet.

Amennyiben a károsodott szakaszon polimeráz csere történik (*Polymerase Switch*, PS) (1. ábra, A) ^{47,48}, a replikáció templátja a sérült DNS szakasz marad. Egy specializált, a polimerázok Y családjába tartozó ⁴⁹, úgynevezett transzléziós polimeráz, vagy a B családba tartozó polimeráz ζ átveszi a replikatív polimeráztól a templátot és elvégzi a szintézist a léziót tartalmazó szakaszon ^{50,51}. E mechanizmust transzléziós szintézisnek nevezzük (*Translesion Synthesis*, TLS) ⁸.

Polimeráz zéta (ζ) és a transzléziós polimerázok többsége (Rev1, polimeráz ióta (ι), polimeráz kappa (κ)) kis hűséggel másolja az információt a templát szárlól, a sérült bázissal szemben nagyobb valószínűséggel nem a bázispárosodás szabályának megfelelő nukleotidot építi be ^{52,53,54,55}. Így a transzléziós szintézis a legtöbb esetben mutációk kialakulásához vezet. Kivételt képez a polimeráz éta, (pol η), amely az UV sugárzás következtében kialakuló T⁺T (timin-timin) dimerekkel szemben nagy pontossággal képes a bázispárosodás szabályának megfelelő adenint beépíteni ^{56,57}.

A másik lehetséges DNS hiba átírási stratégia folyamán nem polimeráz, hanem templát váltás (*Template Switch*, TS) történik (1. ábra, B). Ekkor a DNS hibát tartalmazó régióban a replikatív DNS polimeráz templátot vált, az információt az ép szárlól újonnan szintetizálódott leány kromatidáról másolja. A templát váltásnak két különböző mechanizmusát ismerjük. A posztreplikációs hézagok betöltése történhet a vezető szál leány kromatidájának használatával ^{30,58}. Az újonnan szintetizálódott szál egy rövid szakaszon összeolvad a hibát tartalmazó régióval, a posztreplikációs hézag betöltése során a szintézis templátjául szolgál, miközben egy pszeudo-Holliday junction alakul ki. A szintézis végeztével a struktúra feloldása után a sérült régió is átírásra kerül. E folyamatot „recombinational gap repair”-nek vagy rekombinációs szálcserének nevezzük (1. ábra, F) ^{59,60}. A templát váltás másik lehetséges útja a replikációs villa megfordítása (fork regression). Ebben az esetben a követő szál folyamatos szintézise mellett a vezető szálon (leading strand) a DNS-károsodás következtében megállt replikáció egy asszimmetrikus replikációs villát eredményez. Ekkor elválik a vezető és követő szál az eredeti templáttól és

összeolvad egymással egy „csirkeláb” szerű szerkezetet alkotva ⁶¹. Így lehetővé válik, hogy a vezető szálon a DNS szintézis templátja az újonnan szintetizálódott ép szál legyen. A szintézist követően visszaáll az eredeti állapot és a replikáció zavartalanul halad tovább. A templát váltás fentiekben bemutatott mechanizmusait „copy choice” szintézisnek is nevezik ⁴³.

Mindkét, a templát váltást alkalmazó mechanizmus eredményeként a DNS hibát tartalmazó szakaszon az átírás hibamentes módon zajlik, a lézióval szemben a bázispárosodásnak megfelelő nukleotid épül be, mutációk nem keletkeznek ⁶².

Az itt bemutatott modell azonban hiányos, a DNS hibák tolerálására kialakult folyamatok teljes megértése még sok kísérletes munkát igényel. Ezen útvonalak kutatása még rengeteg megválaszolatlan kérdésre keresi a választ, amelyek közül néhányat említek: Vannak-e még a DNS hibák tolerálását elősegítő, eddig még fel nem fedezett folyamatok? Hogyan érzékeli a sejt a károsodott bázisokat? A DNS hiba a felismerése után hogyan kerül az azt érzékelő apparátustól a különböző DNS hibajavító folyamatok irányítása alá? Mi határozza meg, hogy melyik DNS hibajavító útvonal távolítja el a hibát? Hogyan választ a sejt a DNS hibák kijavítása és az apoptózis között?

3.4 A DNS hiba átírásban résztvevő fehérjék

3.4.1 Ubikvitin

Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló, kis molekulású fehérje ⁶³. A fehérjék poszttranszlációs módosítása során azokhoz izopeptid kötéssel kapcsolódik. Az ubikvitiláció folyamatában egy ubikvitin konjugáló enzim (E2), az ubikvitin aktiváló enzim (E1) által aktivált ubikvitin megkötése után azt ubikvitin ligázzal (E3) együtt azt a szubsztrátra helyezi. A reakció eredményeként az ubikvitin kovalensen, izopeptid kötéssel a szubsztrát molekula egy lizinjére kerül ^{63,64}. A komplex szubsztrátspecifitását az ubikvitin ligáz határozza meg, amely mind E2-vel, mind a szubsztráttal képes kölcsönhatni ^{63,65}.

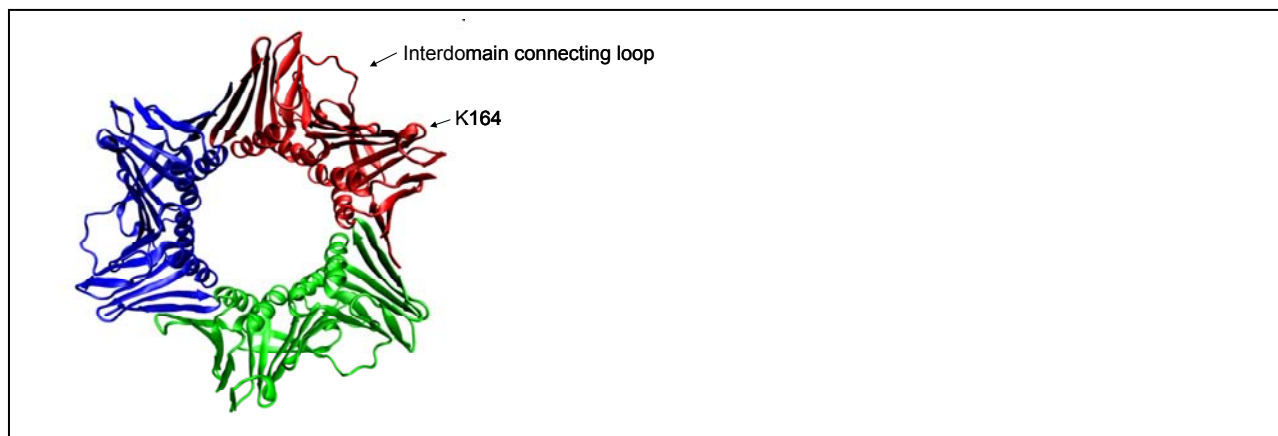
Amennyiben a szubsztrát fehérjére egyetlen ubikvitin molekula kerül, monoubikvitilációról beszélünk. Elsősorban szabályozó szerepe van, fehérje-fehérje kölcsönhatásokat segít elő, jelként szolgál különböző jel-átviteli folyamatokban, DNS hibajavítási mechanizmusokban vagy a gécscsendesítés folyamatában ^{63,66}.

Az ubikvitinből, a benne kitüntetett pozíciókban lévő lizin aminosavakon keresztül poliubikvitin lánc épülhet. Ezek a különböző típusú poliubikvitin láncok más-más funkciót látnak el a célfehérjéken ⁶⁷. A 48-as pozíciójú lizinen keresztül épült poliubikvitin lánc a célfehérjét a proteozómális degradációra jelöli meg, míg a 63-as lizin alapú lánc a proteolízistől független, feltételezhetően szabályozó szerepet tölt be ^{68,69,70}.

A DNS hiba tolerancia útvonalak szabályozásában a résztvevő fehérjék mono- és poliubiquitin-nel történő módosításainak kitüntetett szerepe van.

3.4.2 PCNA (*P*roliferating *C*ell *N*uclear *A*ntigen)

A PCNA a DNS replikáció során a replikatív polimeráz (Polimeráz δ) processzivitási faktoraként szolgál. Homotrimer gyűrűt alkotva, a DNS-t körbeöleli, mintegy “csúszó kapocs” elősegíti a vele kölcsönható replikatív polimeráz kapcsolódását és előrehaladását a DNS-en ^{71,72,73}. Egy PCNA molekulán három domént találhatunk. Egy N-, egy C-terminális domént és a közöttük elhelyezkedő “interdomain connecting loop-ot” (ICL). Az ép DNS replikációjában betöltött szerepén felül, poszttranszlációs módosítások révén részt vesz a DNS hibajavító útvonalak szabályozásában ^{58,74,75}. A DNS-károsodás tolerancia útvonalakban a PCNA 164-es pozíciójában lévő lizin aminosavának ubikvitilációja játszik fontos szerepet (2. ábra).



2. ábra: A PCNA trimer molekula szerkezete és a 164-es lizin aminosav helyzete

Az egyes színek (kék, piros és zöld) a monomereket jelölik

Forrás: http://en.wikipedia.org/wiki/File:1axc_tricolor.png

3.4.3 Rad6-Rad18 (*Radiation sensitivity protein 6-Radiation sensitivity protein 18*)

A Rad6 a DNS hiba átírás során ubikvitin konjugáló enzimként funkcionál (E2), szerepe, hogy az E1 által aktivált ubikvitin megkötése után azt a Rad18 ubikvitin ligázzal (E3) együtt a szubsztrátra helyezze ^{76,77}. A Rad6-Rad18 heteromer komplex szubsztrátspecifitását az ubikvitin ligázként funkcionáló Rad18 határozza meg, mely mind Rad6-tal, mind a szubsztráttal kölcsönhat ^{78,79,80}. A Rad18 fehérje N-terminálisán találjuk az ubikvitin ligázokra jellemző RING finger motívumot. Ezt követi egy cink finger domén, amelynek feltételezhetően DNS kötésben illetve fehérje-fehérje interakciók kialakításában van szerepe. A fehérje C-terminális végén helyezkedik el a Rad6 kötéséért felelős régió ^{79,80}.

3.4.4 Transzléziós polimerázok

Szekvencia és szerkezeti hasonlóság alapján a DNS polimerázokat öt különböző, A, B, C, X és Y családokba lehet sorolni ^{49,81}. Az eukarióta replikatív DNS polimerázok (Polimeráz δ , ϵ , α) illetve a polimeráz ζ a B családba tartoznak, míg a mitokondriális polimeráz γ az A csoportba. A különböző családokba tartozó polimerázok szerkezetileg nagyon eltérőek. Az A, B, C és X csoportokba tartozó, úgynevezett klasszikus polimerázok a polimeráz ζ kivételével nagy pontossággal képesek a DNS-t szintetizálni ⁸². Reakció centrumuk azonban szigorúan csak a károsodástól mentes DNS-t képes templátként használni. A károsodott bázisok a DNS szálaban olyan torziókat okoznak, amelyek megakadályozzák, hogy a klasszikus polimerázok szűk, nagyon specifikus reakciócentruma befogadja őket. Így a DNS hibák a replikációs apparátus előrehaladását akadályozzák. Amint a replikációs polimeráz elér egy lézióhoz, a normál replikáció megáll. Ekkor az Y családba tartozó, transzléziós polimerázok vagy polimeráz ζ veszik át a templátot a replikatív polimerázról. Ezen polimerázok képesek a sérült DNS szakaszt is templátként használni a szintézis során ^{83,84}. A replikáció a léziókon keresztülhalad, a replikációs villa integritása megmarad. Az Y családba tartozó transzléziós polimerázok (Rev1, polimeráz η , polimeráz κ , polimeráz ι) és polimeráz ζ a DNS-t sokkal kisebb pontossággal másolják, mint a klasszikus polimerázok ⁸⁵. Károsodásmentes templáton polimeráz ζ és a TLS polimerázok 10^2 - 10^3 nukleotidonként hibáznak, míg a klasszikus polimerázok 10^6

nukleotidoként ⁸². Károsodott templát esetében eddig egyetlen ismert TLS polimeráz, a polimeráz η képes az UV indukálta timin-timin dimerek hibamentes átírására. Más esetekben a replikációs villa stabilitásának megőrzése transzléziós szintézis által mutációk kialakulásához vezet.

3.4.5 Mms2-Ubc13 (Methyl methanesulfonate sensitivity protein 2- Ubikvitin carrier protein 13)

A Rad6-Rad18 mellett az Mms2-Ubc13 alkotta heteromer ubikvitin konjugáló komplex is részt vesz a DNS hiba átírás folyamatában ⁸⁶. Az Mms2 fehérje a nem kanonikus E2 fehérjék családjába tartozik, amely családnak tagjai ubikvitin konjugáló enzim variánsként ismertek (UEV) ⁸⁷. UEV fehérjékből jellemzően hiányzik a kanonikus E2 enzimek reakciócentrumában lévő cisztein aminosav, amely az ubikvitin konjugálás folyamatában az aktivált ubikvitin tiol-észter kötésen keresztüli megkötéséért felelős ⁸⁷. Az Mms2, a kanonikus E2 fehérjékhez tartozó Ubc13-mal szorosan együttműködve mediálja az ubikvitin K63-as lizinén keresztüli poliubikvitin lánc felépülését ^{88,89}.

3.4.6 Rad5 (Radiation sensitivity protein 5)

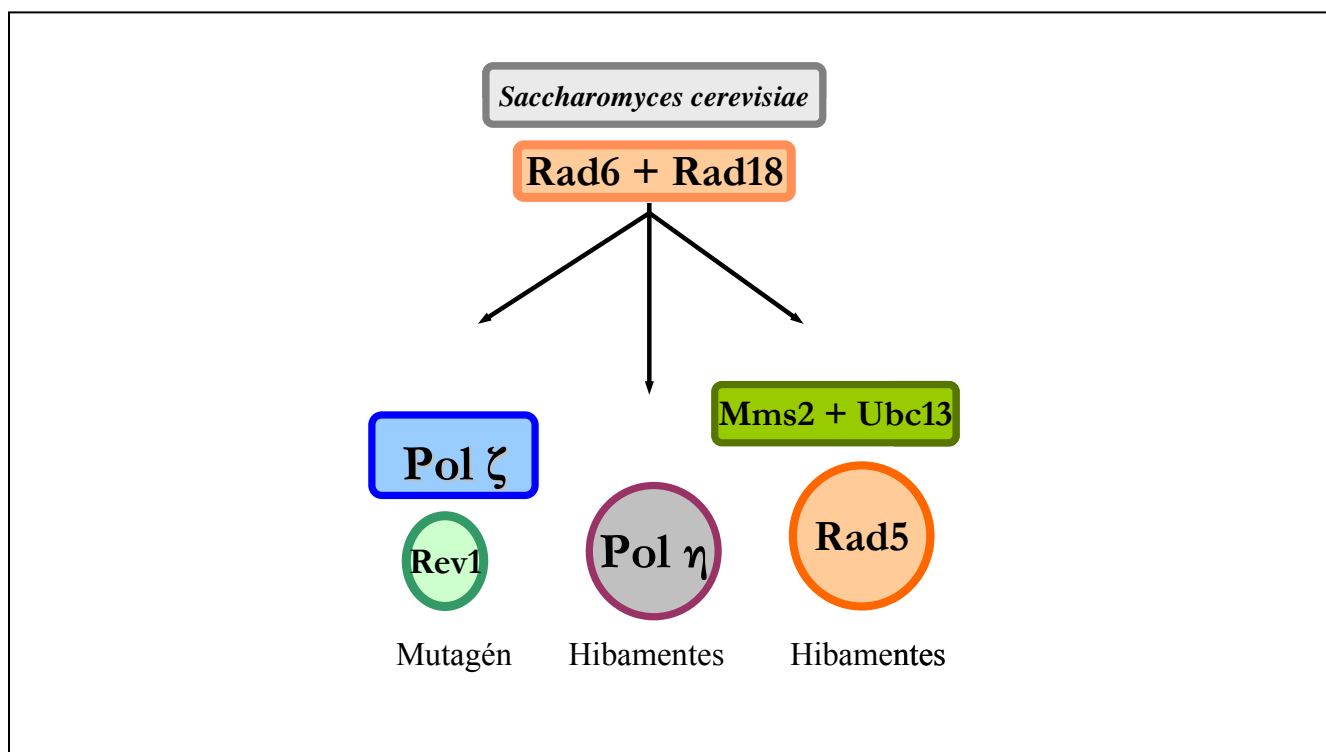
A Rad5 fehérje egy, a SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) fehérje szupercsaládba tartozó DNS-függő helikáz és ATP-áz. Domén struktúrája különleges, a konzervált helikáz domének közé ékelődve hordoz egy, az ubikvitin ligáz fehérjékre jellemző RING finger domént is (6. ábra) ^{90,91}. Ezen elrendeződés nagyon ritkán fordul elő az eukarióta fehérjék között. A Rad5 *in vitro*, kettősszálu DNS transzlokáz aktivitásának köszönhetően replikációs villa-szerű struktúrát képes megfordítani ⁹². A DNS tolerancia útvonalakban ubikvitin ligázként Mms2-Ubc13 komplex-szel együtt poliubikvitilálási folyamatokban, illetve kettősszálu DNS transzlokázként a replikációs villa megfordításán alapuló templát váltó folyamatokban van szerepe.

3.5 A DNS hiba tolerancia útvonalak genetikája és biokémiája

Élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) számos olyan mutációt azonosítottak, amelyek különböző DNS károsító hatásokra érzékennyé teszik a hordozó sejteket. A károsodott DNS átírásának analízise különböző mutáns háttéren azt igazolta, hogy a Rad6 és Rad18 géneknek kulcsfontosságú szerepe van e folyamatban ^{75,92}. Deléciós mutánsuk rendkívül érzékeny UV sugárzásra és MMS (metil-metán-szulfonát, DNS-t alkilálással károsítja) kezelésre. Rad6-Rad18 szerepe a károsodott DNS replikációja során a DNS folytonosságának a helyreállítása ^{93,92,95}. Episztázis analízisek több, a Rad6-Rad18 útvonalba tartozó, egyéb gént is azonosítottak. Ezen genetikai vizsgálatok alapja, hogy két, DNS károsodásra érzékeny mutációt kombinálva két lehetséges dolog történhet. Az egyik, hogy a kettős mutáns érzékenyebb lesz DNS károsodásra, ami azt jelenti, hogy a két vizsgált gén különböző biokémiai folyamatban vesz részt. Deléciójuk okozta érzékenyséjük összeadódik. A másik esetben a kettős mutáns érzékenysége megegyezik a csak az egyik mutációt hordozó élesztő vonal érzékenységgel, azaz a két mutáció episztatikus és ugyanazon biokémiai útban játszanak szerepet. A Rad6-Rad18 irányította DNS hiba átírási folyamatok analízise feltárta, hogy ezen útvonal több episztázis csoportra tagolható ⁸. A Rad6-Rad18 episztázis csoportba tartozó gének mutációi episztatikusak a Rad18 mutációval, de nem mindig episztatikusak egymással. Az UV fény indukálta DNS léziók javítását vizsgálva az azonosított gének három episztázis csoportot alkotnak (3. ábra). Az episztázis csoport tetején a hiba átírási folyamatok szabályozójaként a Rad6-Rad18 komplex áll. Tekintve, hogy a Rad6-Rad18 komplex mindhárom útban résztvevő génekkel episztatikus, azokat szabályozza, a DNS hiba átírás génjeit együttesen Rad6-Rad18 csoportnak is nevezik. A három episztázis csoportból kettőben a résztvevő fehérjék a már említett transzléziós polimerázok. E két, a TLS polimerázokat (élesztőben Rev1, polimeráz éta) és Pol ζ –t alkalmazó csoport között lényeges különbség a sérült bázissal szemben az átírás során beépített nukleotid minőségében van. A Rev1 és polimeráz zéta (Pol ζ) alkotta első csoportban a károsodott bázissal szemben nem a bázispárosodás szabályainak megfelelő nukleotid kerül beépítésre. A hiba átírás ugyan megtörténik, azonban mutáció keletkezésével jár. Az UV sugárzás indukálta DNS léziókat a polimeráz η hibamentes módon képes átírni, mutációt nem okoz a templát szálon jelen lévő sérülés (3. ábra).

Az episztázis csoport harmadik tagjában nem találunk TLS polimerázokat. Itt a replikációs villa mentése a már említett templát váltó mechanizmus segítségével történik. E csoportba tartozik az Mms2-Ubc13 ubikvitin konjugáló komplex, illetve a Rad5 fehérje.

Többé-kevésbé ismert, hogy milyen biokémiai folyamatokat vezényel a Rad6-Rad18 út. A Rad6-Rad18 fehérje komplex egy ubikvitin konjugáló enzim és egy ubikvitin ligáz fehérje komplexe ⁷⁹. DNS károsodás hatására ez a komplex egyszeresen ubikvitilálja a PCNA molekulát ^{58,96}.



3.ábra:

Az UV károsodás okozta replikációs blokk feloldását végző fehérjék élesztőben

Élesztőben az UV fény indukálta DNS hibák átírását végző gének három episztázis csoportot alkotnak. Mindhárom útvonal résztvevőivel a Rad6-Rad18 komplex episztatikus kapcsolatot mutat.

A PCNA monoubikvitilálása valahogy elősegíti azt, hogy a replikatív DNS polimeráz lecserélődjön a TLS polimerázok valamelyikére ⁹⁷. A Rad6-Rad18 mellett a Rad5 fehérje is egy ubikvitin ligáz, ami az Ubc13-Mms2 ubikvitin konjugáló enzim komplex-szel együtt képes a már monoubikvitilált PCNA poliubikvitilálására ⁹⁶. Az így szintetizálódott poliubikvitin lánc nem a proteolitikus degradációra kijelölt fehérjék esetén megszokott K48-as elágazású lánc, hanem az

ubikvitin K63 aminosaván ágazik el⁹⁶. Ez az elágazás nem a degradációra jelöli meg a fehérjét, de hogy mi is pontosan a szerepe azt nem tudjuk^{70,98}. Annyit biztosan tudunk, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz funkciójában hibás élesztő sejtekben ugyanannyira defektív a DNS hiba átírás, mint azokban a sejtekben, amelyekből a teljes Rad5 fehérje hiányzik⁹⁹. E poliubikvitilálás tehát mindenképp szükséges a templát váltó folyamatok létrejöttéhez. A Rad5 RING finger doménjéhez köthető aktivitással szemben a Rad5 ATP-áz doménjéhez köthető aktivitásának szerepéről vannak ismereteink. A Rad5 fehérje, a benne található ATP-áz és helikáz domének segítségével valamint, a kettős szálú DNS transzlokáz aktivitásának köszönhetően képes a sérült bázist tartalmazó szakaszon visszafordítani a replikációs villát a már említett, úgynevezett "csirkeláb" struktúrát formálva abból⁹². E struktúra lehetővé teszi, hogy a sérülést tartalmazó szakaszon az újonnan szintetizálódott komplementer szál szolgáljon templátul. A hibát tartalmazó szakasz átírása után a replikációs villa visszaáll, a replikáció zavartalanul halad tovább. Ezen átírási folyamat, hasonlóan a polimeráz éta képviselte útvonalhoz, hibamentes DNS hiba átírást eredményez, a templát szálon lévő hibás bázissal szemben a folyamat eredményeképpen megfelelő nukleotid épül be, mutáció nem keletkezik.

3.6 A PCNA másodlagos módosításainak szerepe a DDT folyamatokban

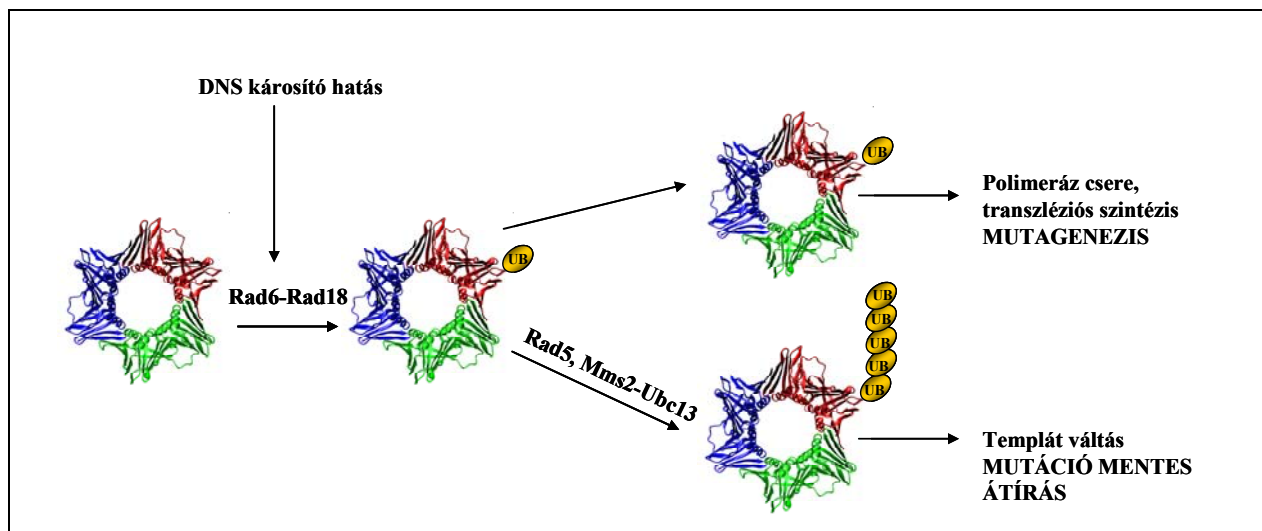
A DNS tolerancia mechanizmusok aktiválásának szabályozása sokáig ismeretlen volt. Az elmúlt néhány évben azonban egyre több élesztőtől és emberi modell rendszerekből származó tanulmány eredményei szerint közvetlen kapcsolat van a DDT útvonalak iniciálása és a PCNA ubikvitinnel történő kovalens módosítása között. A PCNA ubikvitilációja elősegíti a DNS hiba átíró folyamatok létrejöttét. Emellett szerepe van annak szabályozásában, hogy a megállt replikációs villában a hibás, mutációkat eredményező transzléziós szintézis, vagy a hibamentes átírást eredményező templát váltó folyamat játszódjon le.

DNS-károsodás hatására a Rad6-Rad18 komplex monoubikvitilálja a PCNA-t a 164-es pozíciójú lizinjén⁹⁶. A Rad18 –a PCNA és a Rad6 kötése mellett- a DNS-hez is kapcsolódik⁷⁸, így képes arra, hogy az ubikvitiláló apparátust a kromatin kötött PCNA-hoz irányítsa. Biokémiai kísérletek szerint, csak az RFC (*Replication Factor C*) segítségével a DNS-re helyezett PCNA molekula képes ubikvitilálódni¹⁰⁰. Feltételezések szerint, *in vivo* a PCNA monoubikvitilálása a megállt replikációs villákban következik be⁷⁴.

Azt, hogy a PCNA Rad6-Rad18 függő monoubikvitilálása pontosan hogyan szabályozza a TLS-t, egyelőre nem ismerjük, azonban tudjuk, hogy a monoubikvitilált PCNA elősegíti a transzléziós szintézis létrejöttét *in vivo* ¹⁰¹.

A transzléziós szintézis egy fontos folyamat a replikáció folyamatosságának fenntartására DNS hibák jelenlétében, azonban a mutációkat kialakító tulajdonsága miatt szigorúan szabályozni kell működését. A szabályozó mechanizmusok megértése jelenleg a TLS kutatás egyik legfontosabb kérdése.

Élesztőben DNS-károsodás hatására a Rad5, az Mms2-Ubc13 enzimekkel heterológ komplexet alkotva poliubikvitilálja a Rad6-Rad18 által monoubikvitilált PCNA-t ^{102,87,103}. Fehérje interakciós vizsgálatokból tudjuk, hogy a Rad5 mind a Rad6-Rad18-, mind az Mms2-Ubc13 komplexekkel kölcsönhat. A Rad6-Rad18-al való kölcsönhatás kialakításában a Rad5 N-terminális régiója vesz részt, míg az Mms2-Ubc13-mal a RING finger doménon keresztül alakít ki kapcsolatot. Ezen elrendezés következtében, a Rad5 egyidőben is megkötheti a Rad6-Rad18-at és az Mms2-Ubc13-at, lehetővé téve a két különböző típusú ubikvitin konjugáló aktivitás egymáshoz kapcsolását, amely eredményeképp a PCNA molekulára K63-as poliubikvitin lánc épülhet ^{104,103}. További kérdés, hogy vajon először a Rad6-Rad18 monoubikvitinálja-e a szubsztrát molekulát, majd erre az Mms2-Ubc13 K63-as poliubikvitin láncot épít, vagy első lépésként a K63-as poliubikvitin lánc épül fel, amelyet aztán a Rad6-Rad18 a szubsztrátra helyez.



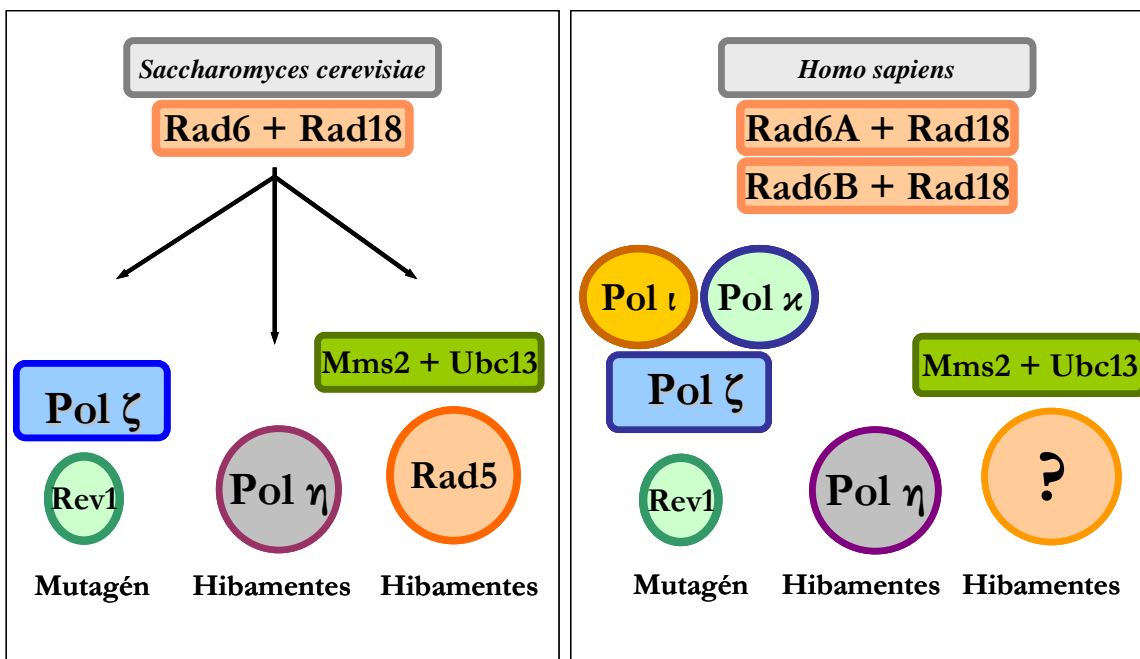
4. ábra: A PCNA ubiquitilálás szerepe a DDT útvonalakban
Színes gyűrű: PCNA trimer, sárga ovális: ubikvitin molekula

A Rad5-nek a folyamatban koordináló szerepe lehet, amelyet a már említett, az ubikvitin konjugáló komplexekkel való egyidejű kölcsönhatással segít elő.

A PCNA Rad5 függő poliubikvitilálása aktiválja a hibamentes átírást biztosító, templát váltáson alapuló mechanizmusokat. A Rad5 deléciós élesztő DNS károsodásra mutatott érzékenységét a Rad5 RING mutánsa csak részben menekíti. A Rad5 ubikvitin ligáz aktivitása tehát nem csak aktiválja, hanem elengedhetetlen feltétele a hibamentes átírást biztosító folyamatoknak ⁹⁹. A Rad5 függő poliubikvitilálás hiányában, a monoubikvitilált PCNA-t igénylő, mutációk kialakulását eredményező TLS kerül előtérbe. A Rad5 függő PCNA poliubikvitilálás így védi a sejtet a mutációk kialakulásától (4. ábra).

3.7 A DDT folyamatok konzerváltsága eukariótákban

A DNS tolerancia folyamatokról, illetve az abban résztvevő fehérjékről kezdetben *Saccharomyces cerevisiae*-n végzett kísérletekből származtak az ismereteink. A DDT mechanizmusok illetve a bennük szerepet játszó fehérjék nagy része az utóbbi években azonban magasabb rendű eukariótákban is leírásra került. Emberi sejteken végzett kísérletek rámutattak ezen folyamatok rendkívüli konzerváltságára.



5. ábra: Élesztőből ismert, napjainkig emberben is azonosított fehérjék

Az élesztőből ismert Rad6, Rad18, Rev1, polimeráz η , polimeráz ζ , Mms2, Ubc13 emberben is megtalálható. Az emberi rendszer azonban összetettebb. Az élesztő Rad6-nak két ismert humán homológja van (Rad6A, Rad6B), illetve a TLS polimerázokból a már említettek mellett több paralógot is ismerünk (polimeráz ι , polimeráz κ). Az azonosított fehérjéken túlmenően mind a PCNA DNS-károsodás indukálta Rad6-Rad18 függő ubikvitilálása, mind a transzléziós szintézis folyamata erősen konzervált ¹⁰⁵. Munkánk kezdetekor kivételt képezett a Rad5 illetve a Rad5 függő hibamentes átírást biztosító mechanizmus, amelynek emberi megfelelője még azonosításra várt.

Az élesztő polimeráz éta emberi megfelelőjének hibája vagy hiánya egy rákos betegséget, a *Xeroderma Pigmentosum Variáns (XP-V)* formáját okozza. Az *XP-V* betegek rendkívül érzékenyek az UV sugárzásra, amely már fiatal korban bőrrákot okoz náluk ^{106,107}. Élesztőben a DNS hiba okozta replikációs blokk feloldását elsősorban a Rad5 fehérje függő folyamatok végzik, míg a polimeráz η és a többi TLS polimeráz szerepe lényegesen kisebb. Ha konzervált a Rad5 függő DNS hiba átírás útvonala, feltételezhető, hogy a Rad5 emberi homológjának (homológjainak) hibája vagy hiánya is súlyos következményekkel, genomikus instabilitással illetve daganatképződéssel járhat.

3.8 Az emberi HLTF (Helicase Like Transcription Factor) és az SHPRH (SNF2 Histone Linker PHD RING Helicase) fehérjék

A HLTF és az SHPRH emberi fehérjék aminosav szekvencia és domén struktúra alapján nagy hasonlóságot mutatnak az élesztő Rad5-tel. A nagyfokú hasonlóság ellenére a köztük fennálló funkcionális homológiára napjainkig nem volt bizonyíték.

A HLTF-et korábbi tanulmányok transzkripció faktoraként írják le. Kimutatják a promóterekre jellemző szekvenciákhoz való specifikus kötődését, illetve dupla szálú DNS függő ATP-áz aktivitást társítanak hozzá ¹⁰⁸. Különböző fehérjék expressziójában betöltött szerepére is rávilágítanak (human plasminogen activator inhibitor-1, beta-globin) ^{109,110}. Más közlemények a HLTF potenciális tumor szupresszor szerepére hívják fel a figyelmet. Megfigyelések szerint a HLTF promótere a gasztro-intesztinális eredetű rákos szövetek 30-70%-ában hipermetilált, így ezekben a szövetekben nem detektálható a HLTF fehérje expressziója.

SHPRH-ról nem állt rendelkezésre funkcionális adat. Egy 2003-ban megjelent tanulmány írja le a klónozását mind egér, mind emberi sejtekből ¹¹¹. A 6q24, tumorszupresszor régiónak ismert kromoszómális régióba térképezhető. Petefészek rákok illetve melanómák 10%-ában mutáns formája fordul elő.

E két fehérje szerkezeti hasonlósága Rad5-höz, illetve a fent említett feltételezett tumorszupresszor szerepük sugallja, hogy mind a HLTF, mind az SHPRH funkcionális homológjai lehetnek Rad5-nek, illetve, hogy az élesztő Rad5 képviselte hibamentes DNS átírási útvonal humán rendszerben is működik.

4 Célkitűzések

Az élesztőben azonosított DNS hiba tolerancia útvonalak, illetve a bennük szerepet játszó fehérjék nagymértékben konzerváltak az eukariótákban. Munkánk kezdetekor azonban nem tudtuk, hogy az élesztő Rad5 függő, PCNA poliubikvitiláláson és templát váltáson alapuló DNS hiba átírási útvonal megtalálható-e emberben is, ugyanis a Rad5 humán homológjai nem voltak ismertek.

Munkám elsődleges célja az élesztő Rad5 fehérje emberi megfelelőinek azonosítása volt. A kísérletes munkát a következő lépésekben végeztük:

- 1) Az élesztő Rad5 fehérje ortológjának (ortológjainak) azonosítása fehérje szekvencia adatbázisok és fehérje szekvencia összehasonlító programok segítségével
- 2) Az azonosított ortológ(ok) és a Rad5 fehérje között fennálló funkcionális homológia bizonyítása a következő kísérletekkel:
 - (a) Komplementációs kísérletek, melyek során arra kerestük a választ, hogy a ortológok képesek-e menekíteni a Rad5 deléciós élesztő törzs DNS károsodásokra mutatott érzékenységi fenotípusát.
 - (b) Rad5 ortológok kölcsönhatásainak vizsgálata a Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13 homológokkal és az emberi PCNA-vel.
 - (c) Vizsgálni kívántuk, hogy a Rad5 ortológok stimulálják-e a PCNA poliubikvitilálását *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerekben.
 - (d) Rad5 ortológok károsodott DNS replikációjában betöltött szerepének vizsgálata emberi sejtekben.

5 Anyagok és módszerek

5.1 Plazmidok

A HLTF cDNS-t Alexandra Belayew (University of Leuven, Belgium) bocsátotta rendelkezésünkre ¹⁰⁹. A teljes hosszúságú SHPRH cDNS-t három, az SHPRH különböző részeit tartalmazó klónokból építettük fel, amelyek a következők: KIAA2023 klón, (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA2023/>, Kazusa DNA Research Institute, Chiba, Japan) ^{112,113} DKFZp686L17246 és DKFZp686E02163 klónok (RZPD German Resource Center for Genome Research, Berlin, Germany, <http://www.imagenes-bio.de/gene>) ¹¹⁴, illetve az N-terminális régiót emberi HEK293FT sejtekből származó mRNS populációból RT-PCR segítségével amplifikáltuk ¹¹⁵. Az összeépített cDNS szekvenciáját ellenőriztük. Az összeépített SHPRH cDNS-t tartalmazó vektort pIL1523-nak neveztük el. Ebben a vektorban az SHPRH cDNS BglII hasító helyek között helyezkedik el.

Az Alexandra Belayew-től kapott HLTF cDNS-t hordozó plazmid a pIL1039 nevet kapta. E vektorban, a HLTF stop kodon után közvetlenül található egy BglII hasító hely. Emellett a HLTF start kodonja előtt található egy SalI hely, amely segítségével, illetve a HLTF-ben található NdeI hely felhasználásával a pIL1039-ből készítettünk egy szubklónt, ahol a HLTF start kodonja elé beépítettünk egy BglII helyet. A BglII hely beépítéséhez a következő oligókat használtuk: 5'-GGCCGTCGACAGATCTTATGTCCTGGATGTTCAAGAGG- 3' és 5'-CCCCAAAAGTCATATGCAGA- 3'. pIL1039-et és a HLTF cDNS-en végzett PCR reakció termékét NdeI, SalI enzimekkel emésztettük, majd a megfelelő fragmenteket összeligáltuk. E klónozás a pIL1001-es nevű plazmidot eredményezte.

Komplementációs kísérletekhez *Saccharomyces cerevisiae* esetében HLTF, SHPRH cDNS-eket pIL1001-ből és pIL1523-ből BglII fragmentként klónoztuk ADH promótert tartalmazó élesztő expressziós vektor (p413ADH) ¹¹⁶ BamHI helyére, míg *Schizosaccharomyces pombe* esetében *Sp. PEVP11* ¹¹⁷ elnevezésű, ADH promótert tartalmazó vektor BamHI helyére.

HLTF és SHPRH fehérjék tisztításához azok cDNS-ét pIL1001-ből és pIL1523-ből BglII fragmentként N-terminális GST tag-et tartalmazó élesztő expressziós vektor (pBJ842) ¹¹⁸ BglII helyére klónoztuk, indukálható *GAL-PGK* promóter mögé.

Emlős sejteken végzett koimmunoprecipitációs és *in vivo* ubikvitilációs vizsgálatokhoz SHPRH, HLTF, PCNA, Ubc13, Mms2, Rad18, ubikvitin cDNS-eket CMV promótert tartalmazó emlős expressziós vektorokba klónoztuk, ahol a fehérjék a megfelelő tag-ekkel N-terminális fúzióba kerültek Flag-el (pRK2F / Dr. Fátyol Károly ajándéka), HA-val (pRK2H / Dr. Fátyol Károly ajándéka), Myc-el (pCS2MT¹¹⁹), 5xHis-el (pRK5His/ Dr. Fátyol Károly ajándéka).

K63 és K48 mutáns ubikvitin-t Cecile Pickart (The Johns Hopkins University, Baltimore) ajándékozta⁸⁷, RFC-t Jerald Hurwitz-től kaptuk¹²⁰.

A K164R mutáns PCNA korábban, PCR alapú mutagenézissel készült (Clontech), a mutációt szekvencia meghatározással ellenőriztük.

5.2 Komplementációs kísérletek

A komplementációs kísérletekhez a deléciós mutáns törzseket (*rad5Δ*, *rad30Δ*, *rad5Δrad30Δ*, *mms2Δrad30Δ*, *rad8Δ*) Dr. Louise Prakash bocsátotta rendelkezésünkre⁸⁶. Ezen törzseket HLTF-et, SHPRH-t ADH vagy GAL-PGK promóterről kifejező plazmidokkal, lítium-acetátos módszerrel transzformáltuk¹²⁰. Az élesztő sejt auxotróf a leucinra és az előbb említett expressziós plazmid tartalmazza a *leu2* gént, amely a transzformánsok szelekciójára szolgál leucin hiányos táptalajon. Transzformáns törzseket logaritmikus fázisig növesztettük, majd tízszeres hígítási sorozatot készítettünk belőlük. Minden hígítási pontból azonos mennyiségű sejtet lemezre csöppentettünk, majd az ábrákon látható dózisú UV sugárral kezeltük (hullámhossz: 254nm, készülék: UVC 5000 Ultra violet crosslinker, 230 VAC, Hoefer). A lemezeket sötétben, 30°C-on 2 napig inkubáltuk, majd a felnövekedett kolóniákat lefotóztuk. A komplementációs kísérletekhez felhasznált leucin hiányos táptalaj összetétele a következő: 6,7 g élesztő nitrogén bázis, 20 g glükóz, 850 ml H₂O, 100 ml a 10x „dropout” oldatból (aminosavanként 0.2 mg/ml oldat, amely a szelekcióhoz felhasznált leucin aminosavat nem tartalmazza), pH 5,8, 20 g agar (lemezhez).

5.3 Fehérjék tisztítása

A GST fúziós fehérjék expressziójára egy vakuoláris proteáz hiányos törzset, BJ5465⁵⁴-et és egy élesztőben fenntartható expressziós vektort (pBJ842¹¹⁸) használunk. Az expressziós plazmid tartalmazza a *leu2-d* gént, ez szolgál a transzformánsok szelekciójára –LEU táptalajon.

A pBJ842 plazmidban a fehérjék cDNS-e a GST (*glutathione S-transferase*) kódoló régióját követi úgy, hogy a két szekvencia között a PreScission proteáz felismerő helye helyezkedik el. A fehérje expressziója galaktózzal indukálható. Sejteket inkomplett szintetikus tápoldatban stacioner fázisig növesztettük, amelyből hiányzott a leucin (táptalaj összetételének leírását lásd. a komplementációs kísérleteknél), majd tízszeresére hígítottuk ugyanezen, azonban glükóz hiányos tápoldattal. Éjszakán át való növesztés után 0.02% galaktózzal, hat órán át indukáltuk a kultúrát. Ezután a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (5000g, 4°C). 5 gramm élesztőt elkevertünk kötő pufferben (20mM Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl, 1mM dithiotreitol, 0.01% Triton X-100, 10% glicerol, 5mM EDTA, 1mM PMSF), üveggyönggyel feltörtük, centrifugáltuk, majd a lizátumot 100µl glutation szefaróz (Ammersham) oszlopra kötöttük. A kötés után a gyöngyöket kétszer mostuk 1 ml feltárási pufferrel, majd egyszer 1 ml mosó pufferrel (20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM dithiotreitol, 0.01% Triton X-100, 10% glicerol, 5mM EDTA). A fehérjéket mosóoldattal eluáltuk, amely 20mM redukált glutationt tartalmazott, vagy éjszakán át inkubáltuk a gyöngyöket PreScission proteázzal, amely a GST epitóp és a fehérje közötti specifikus felismerő szekvenciánál levágta a GST-t a fehérjéről így ezek oldatba kerültek. Végül a tisztított fehérjéket 1µg/µl koncentrációra Microcon 30 (Millipore, Billerica, MA) oszloppal koncentráltuk, -70°C-ra fagyasztottuk.

5.4 GST pull-down kísérletek

A tisztított GST-SHPRH vagy GST-HLTF (3µg) fehérjéket az előbbieken bemutatott módon tisztított Mms2-Ubc13 (2µg) és Rad6-Rad18 (6µg) komplexekkel inkubáltuk 40µl „A” pufferben (75mM NaCl, 40mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM DTT, 0.01% Nonidet P-40, 10% glicerol), 60 percig, 4°C-on. Az elegyhez 20µl glutation szefaróz gyöngyöket adtunk, tovább inkubáltuk folyamatos rázás mellett 6 percig 4°C-on. Ezután a gyöngyöket centrifugálással összegyűjtöttük, mostuk, a nem kötődött fehérjéket eltávolítottuk. A gyöngyön maradt fehérjéket 10mM redukált glutationt tartalmazó „A” pufferrel eluáltuk. Frakciókat 12% SDS poliakrilamid gél-en elválasztottuk, majd Coomassie blue R-250-nel festettük. Kontroll kísérletekben 1µg GST-t használtunk a GST fúziós fehérjék helyett.

5.5 In vitro ubikvitiláció

In vitro ubikvitilációs reakciókat 10µl P0 pufferben (40mM Tris-HCl, pH 7.5, 8mM MgCl₂, 100µg/ml BSA, 10% glicerol, 100mM ATP), illetve 100nM Uba1, 50mM ubikvitin, 10nM RFC (*Replication Factor C*) és 50nM 75/31 nukleotidos részleges heteroduplex - ahol a 75nt-os oligo biotin-sztreptavidint hordozott - és 50nM PCNA jelenlétében végeztük 30°C-on, 60 percig. A reakciókat 12%-os poliakrilamid gélen megfuttattuk, blottoltuk, majd a filtert 3000-szeresre hígított, peroxidáz konjugált, anti-PCNA ellenanyaggal hívtuk elő (PC10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A 75/31 nukleotidos heteroduplex előállításához használt oligók: 75 nukleotidos: 5'-AGC TAC CAT GCC TGC CTC AAG AAT TCC CAT TAT GCC TAC ACT GGA GTA CCG GAG CAT CGT CGT GAC TGG GAA AAC-3', amely mindkét végén egy biotin molekulát tartalmazott és a 35 nukleotidos: 5'-CGA CGA TGC TCC GGT ACT CCA GTG TAG GCA T-3'. Az ubikvitilációs reakció előtt 10pmol biotinilált heteroduplexet 20µg sztreptavidinnel előinkubáltunk. Emellett, vagy egyes szálú M13 DNS-t vagy dupla szálú, BstNBI (New England Biolabs) enzimmel kezelt pUC19 plazmidot is használtuk a reakciókban.

5.6 Koimmunoprecipitáció

A HEK293FT sejteket túltermelő plazmidok különböző kombinációival transzfektáltuk. 24 órával később a tenyészetek felét 40J/m² UV-val kezeltük. Hat óra múlva a sejteket feltártuk SA pufferben (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM EDTA, 400mM NaCl, 15%, glycerol, 0.5% Nonidet P-40). Lizátumokat centrifugáltuk, majd kétszer hígítottuk NaCl-ot nem tartalmazó SA pufferben. Flag epitóp-pal jelölt fehérjéket FLAG gyöngyre (Sigma) kötöttük, majd az immobilizált fehérjéket western blott-tal, 20000-szeres hígítású, peroxidáz konjugált anti-HA ellenanyag (Roche, cat. Numb: 11667475001) segítségével ellenőriztük.

5.7 In vivo ubikvitiláció

A 13. ábrának megfelelően transzfektált HEK293FT sejteket a transzfekciót követő napon kettéosztottuk. 48 órával a transzfekció után a minták felét kezeltük 0.02% MMS-el (metil-metán-szulfonát) 2 órán át. Az MMS kezelés után 4 óra elteltével a HEK293FT sejteket a összegyűjtöttük QNTA pufferben (100mM NaH₂PO₄ (pH 8.0), 10% glycerol, 100mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 1mM PMSF, és 10mM NEM). Sejteket fél órára jégen hagytuk, majd 3-szor 10 másodperces szonikálást követően centrifugáltuk. 500µl lizátumot 20µl Nikkel gyönggyel (NiNTA, Qiagen) 2 órán át, 4°C-on inkubáltuk. A gyöngyöket kétszer mostuk 1ml 1M NaCl-ot tartalmazó QNTA pufferrel, majd egyszer 1ml 100mM-t tartalmazóval, megforraltuk, majd a leforralt fehérjét 12% poliakrilamid gélen elválasztottuk. Mono-, poliubikvitilált PCNA-t anti-HA ellenanyaggal (Roche, cat. Numb: 11667475001, 200000-szeres hígítás), tettük láthatóvá.

5.8 Sejtenyésztés, transzfekció

A kísérletek során felhasznált emberi sejtvonalak: HEK293FT (Invitrogen Life Technologies), HeLa (ATCC). A sejteket 10% borjú savóval (GIBCO) kiegészített DMEM (GIBCO) médiumban növesztettük, 37°C hőmérsékletű, 5%-os CO₂ és magas páratartalmú légkört biztosító termosztátban. Plazmid DNS-sel történő transzfekciókhoz EXGENE (Fermentas) transzfekciós reagenst, míg siRNS transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagenst használtunk a gyártók útmutatása szerint. A kísérletekben használt siRNS-ek (Ambion) szekvenciája:

HLTF siRNS: GGUGCUUUGGCCUAUAUCATT,

Negatív kontroll siRNS: UUCUCCGAACGUGUCACGUGTTT.

5.9 DNS fiber kísérletek

DNS fiber-eket Dean Alan Jackson és munkatársai által leírt módszerrel preparáltuk¹²¹. A sejteket pulzus jelöltük 25µM IdU-val 20 percig, majd 0.018% MMS-el kezeltük. MMS eltávolítása után 250µM BrdU-val újra pulzus jelölést alkalmaztunk különböző ideig. A sejteket összegyűjtöttük, PBS-el mostuk. 1000 sejt/µl-es szuszpenziót készítettünk belőlük. A szuszpenzióból 2 µl-t tárgylemezre csöppentettünk, majd 8µl feltáró oldattal (0.5% SDS, 1mM

EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.5) óvatosan összekevertük és 7 percig állni hagytuk. Ezután a tárgylemezt 25°-os szögben megbillentettük, megvártuk míg a már feltárt sejtszuszpenzió lefolyik a tárgylemez aljáig. A tárgylemezeket hideg metanol ecetsav 3:1 arányú elegyével fixáltuk, szárítottuk, immunfestés előtt éjszakán át 4°C-on tároltuk.

A beépült IdU-t egér anti-BrdU/IdU elsődleges, (1:1000 hígítás, Invitrogen, MD5100) majd Cy3 konjugált másodlagos ellenanyagokkal (Sigma, C-2181), míg a BrdU-t patkány anti-BrdU (1:1000 hígítás, Oxford Biotechnology, OBT0030G BRDU [BU1/75(ICR1) elsődleges, majd AlexaFluor-633 konjugált másodlagos ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A megfestett DNS fiber-eket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (63x lencse).

DNS fiber-ek hosszát FV10-ASW 1.6 viewer program segítségével mértük le. A fiber-ek hosszát (μm) 2.59-cel szorozva kiszámoltuk, hogy azok hány kilobázist jelentenek¹²¹. E számot elosztva a pulzus jelölés időtartalmával meghatároztuk a replikációs villák átlagsebességét (replikációs ráta, V_r). A kísérleteket háromszor elvégeztük, egy-egy statisztikai analízishez 150 DNS fiber-t számoltunk meg

6 Eredmények

6.1 Az élesztő Rad5 fehérje strukturális emberi megfelelőinek azonosítása

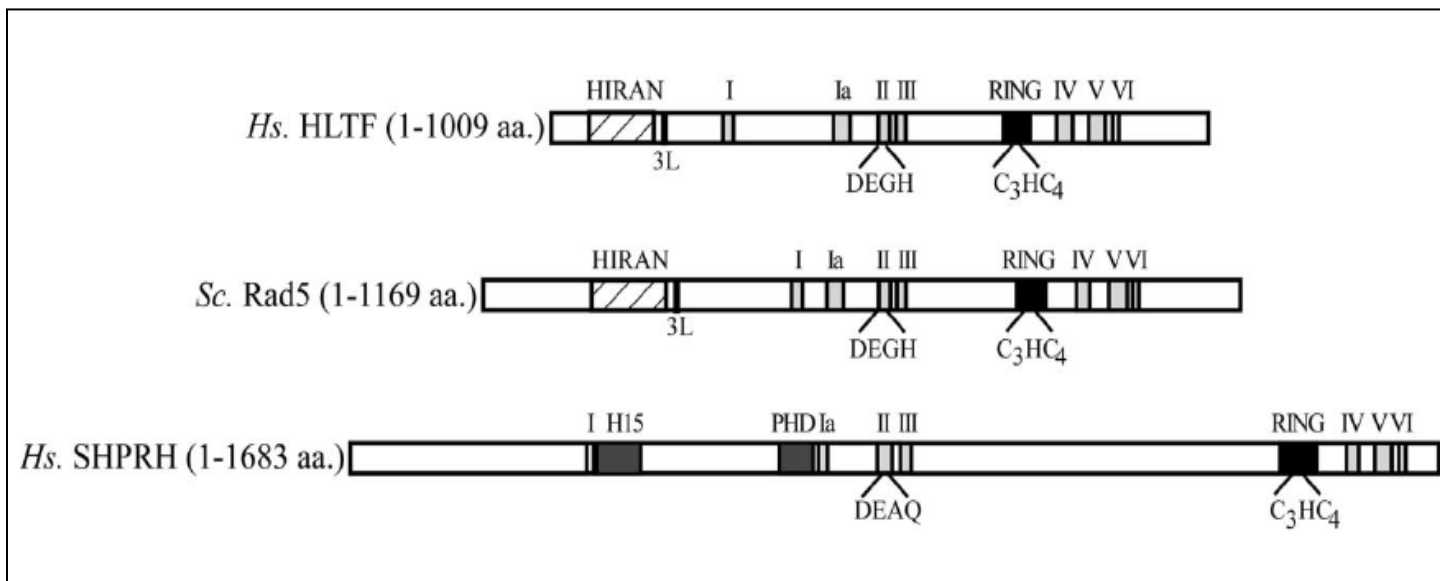
A Rad5 élesztő fehérje emberi ortológjainak azonosítását a BLAST program segítségével (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a program által felajánlott szekvencia adatbázisok (Non redundant protein sequences, Reference proteins, Swissprot protein sequences) szűrésével kezdtük. A szűrés alapjául az élesztő Rad5 fehérje aminosav szekvenciáját használtuk. A „blastp” algoritmussal két emberi fehérjét, a HLTF-et és az SHPRH-t találtuk, amelyek aminosav szekvenciája és domén szerkezete nagy hasonlóságot mutatott Rad5-tel (6.-7. ábra). A homológia mértékének meghatározásához a Rad5, a HLTF és az SHPRH aminosav szekvenciáját a „Multalign” (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) programmal ¹²², illetve kézzel egymáshoz illesztettük. A kémiaiailag hasonló és azonos aminosavakat figyelembe véve a HLTF 46%-os, az SHPRH 37%-os hasonlóságot mutat Rad5-tel (6.-7. ábra). Mindkettőben megtalálható a Rad5-re is jellemző, SWI/SNF családdhoz tartozó, hét motívumból álló helikáz domén, illetve a harmadik és negyedik helikáz domén közé ékelődött RING finger domén. Szekvenciája, domén összetétele alapján az SHPRH távolabbi Rad5 homológnak tekinthető mint a HLTF. A HLTF és a Rad5 N-terminálisán található egy szekvencia elem, a HIRAN domén, (*HIP116*, *Rad5p N-terminal*) amely az SHPRH-ban nincs jelen, funkciója jelenleg ismeretlen, predikciók DNS hiba felismerő, DNS kötő aktivitást társítanak hozzá ¹²³. Az SHPRH N-terminálisát két motívum, a hiszton linker fehérjékre jellemző H15 és egy PHD domén gazdagítja, amelyek sem a Rad5-ben, sem a HLTF-ben sem találhatók meg (6-7. ábra). Ezen felül az SHPRH-ban a III. és IV. helikáz domén között elhelyezkedő inszerció hosszabb, mint a Rad5-ben vagy a HLTF-ben. Továbbá a Rad5 és a HLTF ATP hidrolízisében szerepet játszó II. helikáz doménjében a nukleotid kötő motívum DEGH szekvenciájú, míg ugyanez a szekvencia elem az SHPRH-ban DEQH ¹¹¹ (7. ábra).

Irodalmi adatok szerint az SHPRH mutáns formája fordul elő melanoma és petefészekrák sejtvonalak 10%-ában ¹¹¹, míg a HLTF kifejeződése promóterének metiláltsága következtében gasztrointesztinális rákok 30-70%-ában gátolt ¹²⁴. Ezen megfigyelések alátámasztják azon

feltételezésünket, hogy a Rad5 emberi megfelelőinek szerepe van a rákos elfajulási folyamatok elleni védelemben.

A HLTF mRNS-éről két, az N-terminális régióban különböző fehérje termék keletkezik emberi sejtekben. A 123. pozícióban található egy metionin, amely egy alternatív transzlációs start kodonként funkcionál, amely egy rövidebb 886 aminosavas fehérjét eredményez a teljes hosszúságú, 1009 aminosavas fehérjével szemben ¹⁰⁸. A rövid izoformából a HIRAN domén hiányzik. Irodalmi adatok szerint ezen izoforma transzkripciós faktorként specifikus promóter régiókhoz kötődve fehérjék transzkripcióját aktiválja ¹⁰⁷. Példa erre a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAL-1) fehérje, amely promóterének B box eleméhez kötődve annak transzkripcióját serkenti ¹⁰⁸. Ezzel szemben a HLTF hosszú izoformájáról, mely a HIRAN domént tartalmazza, nem mutattak ki transzkripciós faktor aktivitást. Kísérleteinkben a HLTF hosszabb izoformáját kódoló cDNS-t használtuk.

Bár az SHPRH távolabbi Rad5 homológjának tűnik a benne lévő H15 és PHD domének miatt, mégis a helikáz és a RING finger doménekben mutatott hasonlóság alapján mind a HLTF-et, mind az SHPRH-t a Rad5 strukturális homológjának tekintettük és a következőkben a funkcionális homológiára irányuló vizsgálatokat mindkét fehérjével elvégeztük.



6. ábra: A Rad5, a HLTF és az SHPRH domén szerkezete.

HIRAN domén, konzervált helikáz domének, RING domén, H15 és PHD domének, 3L- Három, egymást 6 aminosavanként követő leucin ismétlődés, DEGH, DEAQ: ATP-áz domén szekvenciái, C₃HC₄: RING finger domén rövidített szekvenciája

Hs. HLTf	1	MSMWRKRDVWKYVQTVQYGVHGNFPRSY-PTFFPRFEDVIPPDDFL-----SDEE-----	54
Hs. SHPRH	1	MSSEKRPAPRVYVDEEKQQLHNNMHEDRRNKEHLI-----S-----DDDEQDGG-SDTSSAHYITLSDS-----	120
Sc. Rad5	1	MSHLEOEKRKRFRNDDLTSETSLNKSSEKESFLFANSHN-----DDDDVWVSVDTEGEED-----RSIVPVRRELEEGNQFITELLRITPEMPKDLVMELENEKSSQEEGLSPALSHVFDHNS-----GTS	125
HIRAN			
Hs. HLTf	55	-----VDSVLFGLSRSHVWGLRYTVGVNNSMAALSDPNNPYDKN-----AIKNNVNV-GNOVGHKKSLAGALAYMD-----	124
Hs. SHPRH	121	LCGLDPAASLIENF-SERSHILMSSESSNQF-----LIYVHSKGEDVKKQKKEPMSIC-----	171
Sc. Rad5	126	TSMTSSSPNQNLTLSDTSNSHSP-SSPHPKRRRIYGFPRNQTRLEDKV-----TWKRFGIALQVTSMAPIRVPVRPKYGSMAVMSSEISATKVYDSRGRKKASMASLVRIPDIQYDRFICRVSSEIAQIQLYTPHS	255
Hs. HLTf	125	NKLAQLEQVTFEGANNATMPLHMTWNGKEE-----NRKAVSD-QKKKHGFKLPAPKRLGFLNLESGWGSRAGPSYSMPVHAAYQMTPEQKTEFDKLFEDLKEDDKTHEMSFAEA	235
Hs. SHPRH	271	DIIDELYEFVKQTHQETPSIQVDVQHPALIPV-----LPHYQRENVMMMLQCCFBSSBATESALHFLWREIVTSEPLKLYNYPYEQITRPN-----SG-----	367
Sc. Rad5	256	SEIESEVYVLEICDKRRLSGDSITQLDCRHTSLIFERNDGSSMKRRRTTEGGNREKDNNGFRTTETDEPLESRSSRLALLKLFKRLRKPIIDCKALSSHKIPLNSDPELITDITLUNDRI-----CSNQV	386
L I L			
Hs. HLTf	236	LETP-----LPHOKQNLMMVSRENSKLPFPWFQRND-----VYNNFTN-----SSPDRPENNV	288
Hs. SHPRH	271	DIIDELYEFVKQTHQETPSIQVDVQHPALIPV-----LPHYQRENVMMMLQCCFBSSBATESALHFLWREIVTSEPLKLYNYPYEQITRPN-----SG-----	367
Sc. Rad5	387	EYHNNLEDTQHEEEDNNQLKTYEAAQSSSELKSLPETEPSRDVPKLELNQVQQLTWMLREQEFAKAASDSEASETANNNINPLKQEPNPDMSSMAAQNQADHVNVVEDGIFYFANLHSCPSSEAKETLKTMTIK	526
Helicase I			
Hs. HLTf	289	GGILADDMGLGKTT-----TAIAVILTNFDRP-LPHERVKNLLKAYVNDMSK-----LCNNITSEADGLSK	355
Hs. SHPRH	368	GGILADEMGLGKTVBVALLLTHTRQ-DVQDAITLPEKGVVNNYTPSHVFGGLKKTETINIEFEPEKEVQCPPTVRMILTAVKEMNGKCVSILSHYKVVSSIYRVDQRASLKKRMKLCITPEELVKLKGHGFS	506
Sc. Rad5	527	GGILSDEMGLGKTVAAISLVLSCPHDSVVDKKCFDIENTAVSDNPSSTWQDNKKPYASKTT-----	588
Linker histone H1 and H5			
Hs. HLTf	356	DAS--RCSEQPSISDIKEKSK-----RMSSELSSEPKRKRAVQVLESDSEETSETSLPQ-KMKGKLKNQSETKGRAMASSK-----VIDVAFACALTSVPTTKKKMLKGGACAVGSGSKKTVEEERNT	478
Hs. SHPRH	507	TFTLSENYKEEDLCCKTKKQAVGSPKIKQERASGNKTDNDSEYLPSDTSDDDPDPYIYYKSSERNRSKLRKKLPVSTKRGSGPPFNPDSQGHCPATSDSGIDVAV-SSSTQSEFNQEHETEDCAEFLNHADSDVPP	645
Sc. Rad5			
PHD-finger			
Hs. HLTf	479	-----LITGPTSLVDSWIDFGLHKSQ-VHLNFTVYVYTPPTIRPEALLSKQV-----IVLTITNVLITPD-----YGT	540
Hs. SHPRH	646	SNTMSPFNSTSDYRFECICGELDQIDRKPRVQCLKCHLWQHAKCVNYDEKNLKIKPFYCPHCLVAMEPVSTRA-----LITGPTSLVDSWIDFGLHKSQ-VHLNFTVYVYTPPTIRPEALLSKQV-----IVLTITNVLITPD-----YGT	783
Sc. Rad5	589	-----LITGPTSLVDSWIDFGLHKSQ-VHLNFTVYVYTPPTIRPEALLSKQV-----IVLTITNVLITPD-----YGT	655
Helicase II			
Hs. HLTf	541	KGSPLHSIRWRR-----VILDEGHAIKRNPAQAQTKAVLDLESERBVLVTGTPDINSKHLWLSLSFLAKLPHDRPWHEDIORPVMGD-EGGLRRLQSLKQNLIRRT-KTSKIK-SKPVLEL	658
Hs. SHPRH	784	TPHSNSEDGRPLRNQKRYMAIDSPVAVMMHCHLDEAVVECPPTVKAEMAORLSGNRRTISGTPVPRGHEDLFLAVWELCHEPYCVKHHWRLLRPPYCKNPOHLYSEIACHWRSARKVDVIDQIIPOTEEH	923
Sc. Rad5	656	KGRWIDEDYN-----ISSQLSVSEYFTITDEGHNIRNRTVITSKAVMALQGSCKKWLVTGTPINRDDLYSLVKFLQDPNQINYNKTEVSTPEESKNYKQAFDVVNALEPVLIRRT-KOMKCKSKPVLVL	784
Helicase III			
Hs. HLTf	659	PPKRVPTQHLIDSDBERKTYQSVKNEGRATIGRYNECHVAHYADVLGLLLRLRQICCHY-----LLTNA-----VSSNGPSGNDPEELRKKLTKRKMLSSGS	759
Hs. SHPRH	924	LHFSVPRSHFVHQHVECCQDVVVKLRKVSCKSSSLDRRTVTSILYPLLRLRQACCHCAVRGEFLPLQKSTMTMEELTSLQKCGTECEBAHROLVCAINGLAGIHIIKGEYALAAAYREYRLSRSEEHKGLK	1062
Sc. Rad5	785	PPKRVPTKLPFFKQSQDLLYKELLDKKETSQWALIAKSLMLKYSTILVHLRLRQVCCHPG-----LISQDENDELKSNKLVTEQVELDSLRVVSERFDNSFS	908
Helicase IV			
Hs. HLTf			
Hs. SHPRH	1063	TDSLQRLHATHNLMELLIARHGPIPTLRDGRLEEEAKQLREHYMSKCNTEVAEAQALYPVQQTITHELQRKIHNSPWWLNVIHRAIEFTIDEELVQRVRNEITSNYKQQTGKLSMSEKFRDCRGLQLFLTQTMEELNK	1202
Sc. Rad5	909	FQSL-----	913
RING-finger			
Hs. HLTf	760	-----NAICLDS-----LTPVPIHCAHWFCKPCICVQVIO-----NEQPAKCPCLCNHEDNLEPC-PPPELAADS	821
Hs. SHPRH	1361	RVRDPRPKPNPPVLHIEPEHEVQNRKILLNDKAFATSQKQKLGQLLYLTNLEKSQDKTSGGVNPEKEDICARQ-LQKMAVLT-CGHCFONECISHIIEQYSVSGSHRSSKCAIC-RDTTSHREISVFTSEKANE	1499
Sc. Rad5	914	-----CSICTTEPMDLRLALFECGHSPCEKCLFEYIEFQN-----SKNLGKPCNCNQIDACRLIAVLTNSNSKNL	953
Helicase V			
Hs. HLTf	822	PKKSDMEMSSSKINALMHALDILRKNNPILRLVVSQFTTFPLSLIEHPL-----KASGFVPRLDGSMAGKRKVESQCFQNTGAGSPITLLSLKAGGVGLNLSASRVFLMDPAWNPAEDCFDRCHRLGCKKCVIT	957
Hs. SHPRH	1500	EDIE-LKGSHTKYVAVVRMLMKIQIRFEGAKLVFSTWQVLDITISKAL-----NNMFEFASLRVVKTPENLSAF-----KRDPOINTLLPLHNGSGLTIHATHVLLVSPILNPAHELOAIKRVHRIQQTKEHIV	1629
Sc. Rad5	915	PKKSDPASKSSKITALLKPLQLLODSSACQVIFSQSTYLDILERSLHTFSKDVAMLYKFDGRLSLKERTSVLADFAVKDYSRQKILLLSLKAGGVGLNLTQASHAYMMQPPWWSPSMEDQAIIDLHRIQQTNSRV	1122
Helicase VI			
Hs. HLTf	958	TKFIVKDSVEENLKLQNKRELAAGAFGRKPNADENKQAKINEFRLTIDL-----	1009
Hs. SHPRH	1630	HRFLIAETIEERM-CAMLTAKDESHNTSSASHSASVLTVALADLPHKETELE	1683
Sc. Rad5	1123	MRFLIIDSIEKMLRIRKRRTPQAM-----DTLFDERRKRRTEIQLMFE-----	1169

7. ábra: A HLTf, az SHPRH és a Rad5 fehérjék szekvenciájának összehasonlítása.

Kémiaailag hasonló és megegyező aminosavakat figyelembe véve a HLTf 46%-os, az SHPRH 37%-os hasonlóságot mutat a Rad5-tel. Más, funkcionálisan homológ élesztő és emberi fehérjékhez képest, ezen homológia átlagosnak tekinthető.

Sötétítés: kémiaailag azonos és hasonló aminosavak, Keretezés: egyes fehérje doméneket jelöli, Négyzetbe foglalt L: leucin ismétlődések jelölése

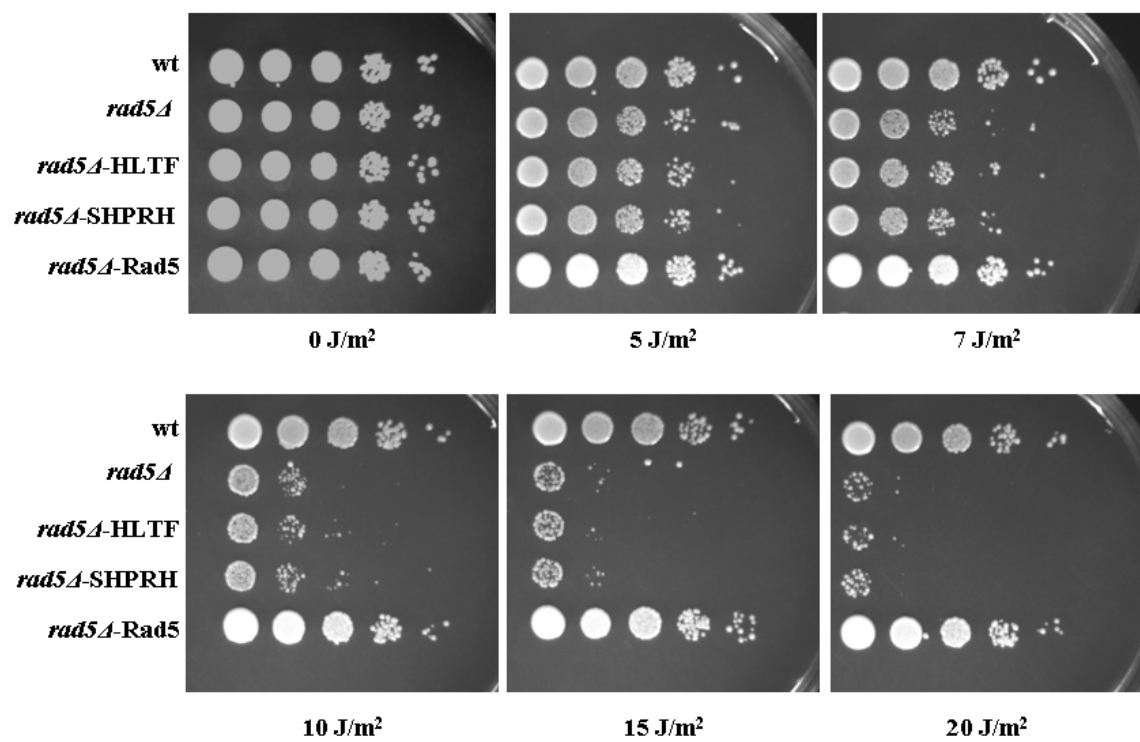
6.2 A HLTF részlegesen menekíti az élesztő Rad5 DNS károsító hatásokra mutatott érzékenységét

A HLTF, az SHPRH és a Rad5 között fennálló funkcionális homológia ellenőrzésére irányuló kísérletekben először megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH képes-e menekíteni vagy enyhíteni az élesztő *rad5* deléciós mutáns UV besugárzásra mutatott érzékenységét. A HLTF és az SHPRH cDNS-ét élesztő expressziós vektorokba klónoztuk. Az elkészült plazmidokat *rad5* deléciós mutánsba transzformáltuk, a transzformánsok UV érzékenységét összehasonlítottuk a *rad5* deléciós és vad típusú élesztő törzsek UV érzékenységével. A kísérletben pozitív kontroll volt egy olyan *rad5* deléciós törzs, amelyben a Rad5 fehérjét expresszáltuk ugyan olyan plazmidról mint amilyenről HLTF és SHPRH termelése is történt (8. ábra, A panel, alsó sor). A Rad5 expressziós plazmidot Dr. Louise Prakash bocsátott rendelkezésünkre. Sem HLTF, sem az SHPRH nem enyhített a *rad5* deléciós törzs UV érzékenységi fenotípusán (8. ábra, A panel). Annak érdekében, hogy a HLTF, illetve az SHPRH hatását láthatóvá tegyük, tovább érzékenyítettük a kísérletet *rad30rad5* kettős deléciós mutáns alkalmazásával a *rad5* egyes mutáns helyett. (*rad30* gén kódolja élesztőben a polimeráz éta fehérjét.) Ezen az érzékenyített háttéren a HLTF UV érzékenységet csökkentő hatása egyértelműen megfigyelhető volt (8. ábra B panel). Az SHPRH-val nem figyeltünk meg komplementációt a *rad30rad5* háttéren sem (8. ábra, B panel). Ismert, hogy a Rad5, a DNS hiba átírás mellett szerepet játszik a Röntgen sugárzás okozta dupla szálú törések javításában is¹²⁵. A menekítési kísérleteket Röntgen sugárzás alkalmazásával is elvégeztük. Itt is hasonló eredményeket kaptunk, a *rad30*-al érzékenyített *rad5* deléciós háttéren a HLTF jelenléte a sejtek túlélését megnövelte, míg az SHPRH nem (8. ábra, C panel).

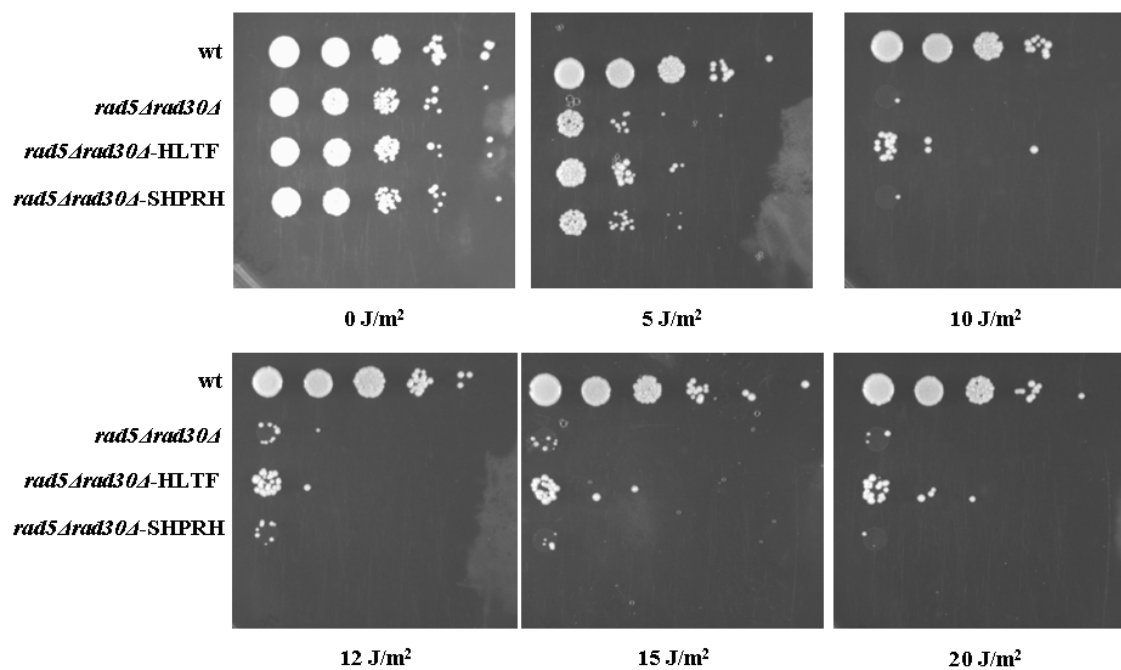
A komplementációs kísérleteinket *Shizosaccharomyces pombe*-ban is elvégeztük. Hasadó élesztőben *rad8* deléciós háttéren (*Sp.Rad8* a *Sc.Rad5* megfelelője¹²⁶) vizsgáltuk a komplementációs hatást. A HLTF részlegesen komplementálta a *rad8* egyes mutáns UV érzékenységi fenotípusát, míg az SHPRH itt sem mutatott menekítő hatást (8. ábra, D panel).

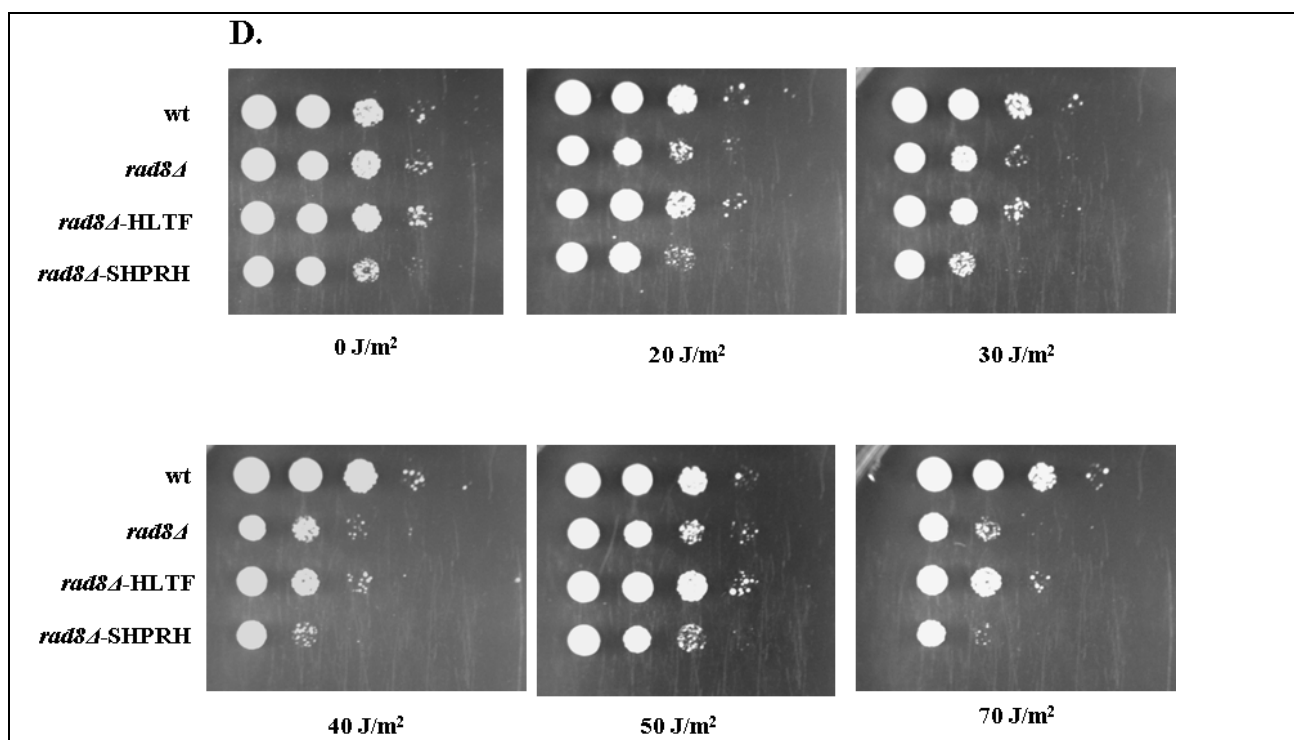
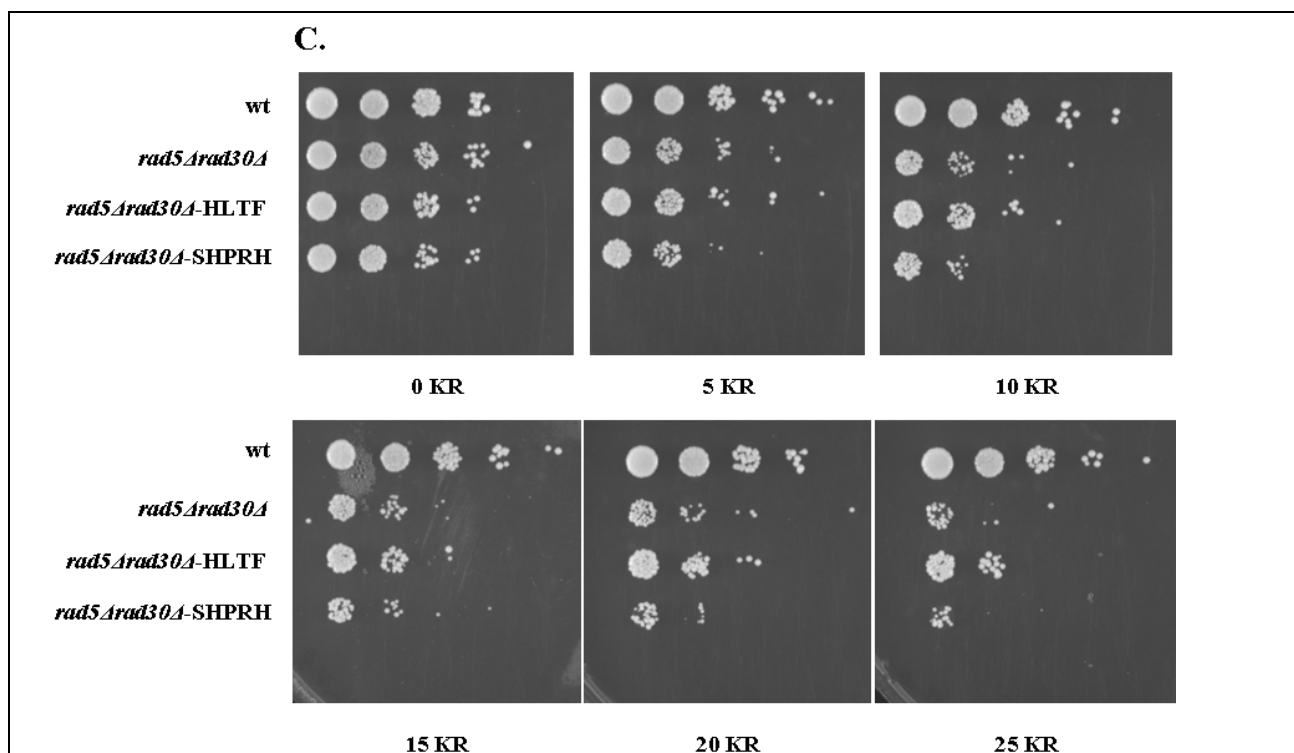
A HLTF komplementációs hatása a HLTF és a Rad5 között fennálló funkcionális homológiát jelzi, illetve a Rad5 funkcióinak konzerváltságát is mutatja. Azonban az SHPRH és a Rad5 közti funkcionális homológia ellenőrzésére más kísérleti megközelítés szükséges.

A.



B.





8. ábra: A *HLTF* részlegesen menekíti a *rad5rad30* deléciós törzs UV és Röntgen (RTG) sugárzásra mutatott érzékenységét.

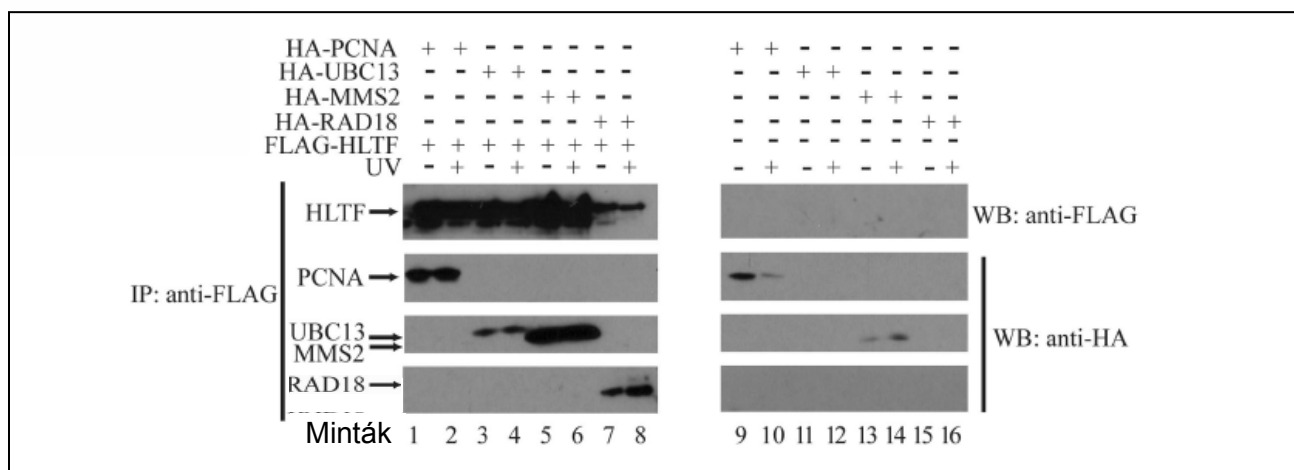
A kísérlet során a jelzett törzseket logaritmusikus fázisig növesztettük. Megszámoltuk, majd egyenlő mennyiségű sejtekből ($10^7/\text{ml}$) tízszeres, négylépéses hígítási sorozatot készítettünk, amelyekből 10-10 μl -t lemezre raktunk. Ezután a lemezeket a jelölt UV vagy RTG dózissal kezeltük, 2 napig 30°C-on inkubáltuk, majd értékeltük.

6.3 A HLTF és az SHPRH kölcsönhat a Rad5 kölcsönható partnereinek emberi megfelelőivel

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH kölcsönhat-e a Rad5 interakciós partnereinek emberi megfelelőivel. A kölcsönhatásokat *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerekben is ellenőriztük.

6.3.1 *In vivo* koimmunoprecipitációs kísérletek

HEK293FT emberi embrionális vese eredetű sejteket kotranszfektáltunk Flag epitóp tag-el jelölt HLTF-el, illetve HA (haemagglutinin) epitóp tag-el jelölt hRad18-al, hMms2-vel, hUbc13-mal vagy hPCNA-val páronként. A sejteket lizáltuk, majd a lizátumokat anti-Flag gyöngyökön precipitáltuk. A kísérlet eredményeként a Flag-HLTF és a hozzá kötődött fehérjék koprecipitációját vártuk. Az interakciós partnerek HLTF-en keresztül történt koprecipitációját anti-HA (anti-haemagglutinin) ellenanyaggal ellenőriztük. A 9. ábrán látható, hogy a hPCNA, a



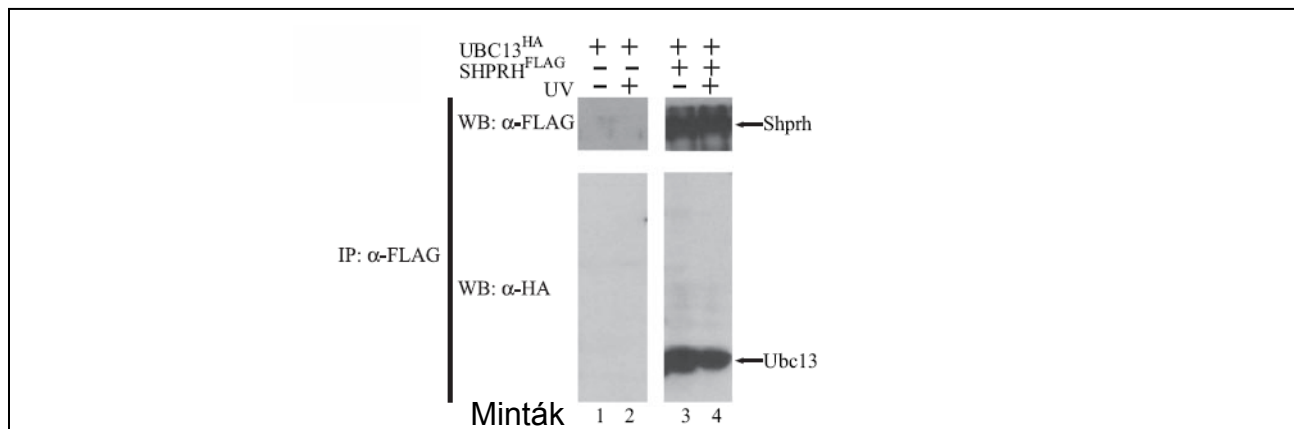
9. ábra: A HLTF *in vivo* asszociációja hPCNA-, hUbc13-, hMms2-, hRad18-al HEK293FT sejtekben

A HA-hPCNA-t, HA-hUbc13-at, HA-hMms2-t, HA-hRad18-at Flag-HLTF-el tranziensen koexpresszáltuk. 36 órával a transzfekció után a sejtek felét 40J/m^2 UV-val kezeltük. 6 óra inkubációs idő után a sejteket feltártuk, a teljes sejt-lizátumokat anti-Flag gyöngyökön precipitáltuk (jobb és bal oldali panelek, IP-immunoprecipitátum). A precipitátumokat western blott-tal, a HA epitóp tag-el jelölt fehérjék jelenlétére ellenőriztük anti-HA ellenanyaggal (1-16 minták) (WB-western blott), Flag-HLTF jelenlétére pedig anti-Flag ellenanyaggal (1-16 minták, legfelső panel). A precipitációs kísérletek specifikusságát Flag epitóp tag-et önmagában expresszáló konstrukció segítségével ellenőriztük (9-16 minták).

hRad18, a hUbc13 és a hMms2 koprecipitálható HLTF-el emlős sejtekből (9. ábra, A panel, 1-8 minták). A koprecipitáció specifikusságát a csak Flag tag-et kifejező mintákkal bizonyítottuk (9. ábra, A panel, 9-16 minták). A ko-immunoprecipitációs kísérleteket UV kezelt sejteken is elvégeztük és kimutattuk, hogy az UV kezelés nem hat az interakciók kialakulására (9. ábra, A panel, 1-8 minták)

Ugyanezen kísérleti körülményeket használva ellenőriztük, hogy az SHPRH-val együtt a hPCNA, a hRad18, az hUbc13 valamint az hMms2 koprecipitálható-e emlős sejtekből. A koprecipitációt hUbc13-mal figyeltük meg (10. ábra, B panel, 3-4 minták), amelynek specifikusságát ebben az esetben is csak a Flag tag-et kifejező mintákkal bizonyítottuk (10. ábra, B panel, 1-2 minták). Az UV sugárzás itt sem volt hatással az SHPRH és hUbc13 komplex kialakulására.

A koimmunoprecipitációs eredményeink alapján a HLTF azonos komplexben található - emberi sejtekben- a hPCNA-val, a hRad18-al, az hUbc13-mal és az hMms2-vel, míg SHPRH az hUbc13-mal. E kísérletek nem adnak információt arról, hogy a vizsgált fehérjék között közvetlen interakció van-e, vagy egy köztes fehérjén keresztül kapcsolódnak-e egymáshoz. A fehérjék közötti közvetlen interakciót *in vitro* rendszerben, tisztított fehérjékkel vizsgáltuk tovább.

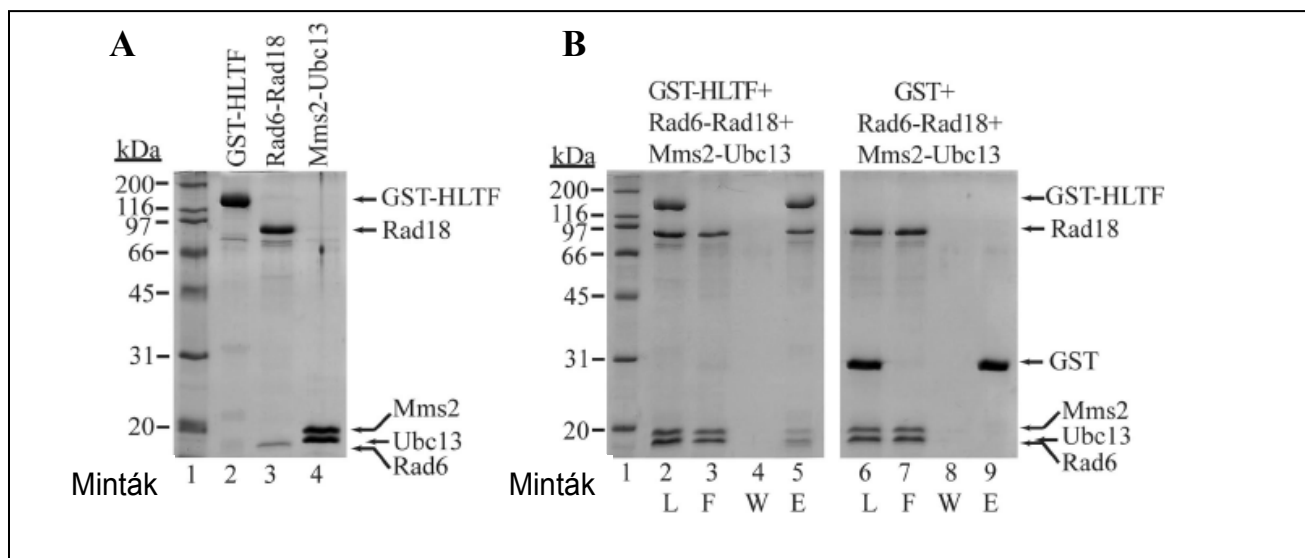


10. ábra: SHPRH *in vivo* asszociációja hUbc13-al HEK293FT sejtekben.

HA-Ubc13-at, Flag-SHPRH-t tranziensen koexpresszáltuk HEK293FT sejtekben. 36 órával a transzfekció után a sejtek felét 40J/m² UV-val kezeltük. 6 óra inkubációs idő után a sejteket feltártuk, a teljes sejtizátumokat anti-Flag gyöngyökön precipitáltuk. A precipitátumokat western blott-tal (WB) a HA epitóp tag-el jelölt fehérjék jelenlétére ellenőriztük anti-HA ellenanyaggal (3-4 minták), Flag-SHPRH jelenlétére pedig anti-Flag ellenanyaggal. A kísérletek specifikusságát Flag epitóp tag-et önmagában expresszáló konstrukcióval ellenőriztük (1-2 minták).

6.3.2 In vitro fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletek

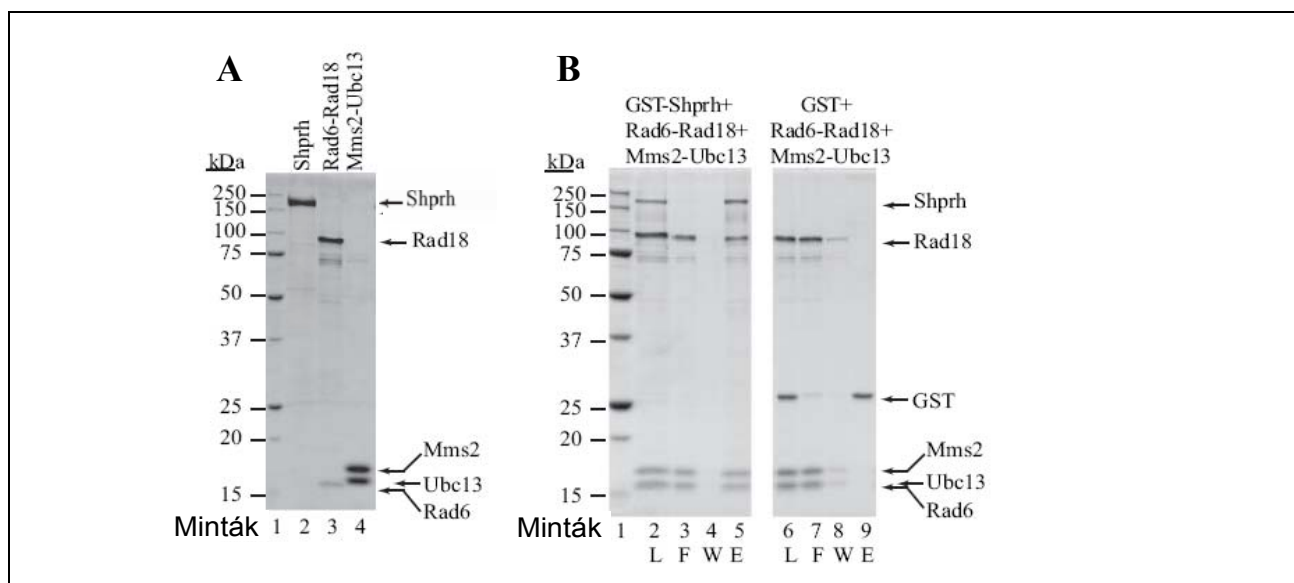
A HLTF és az SHPRH hPCNA-val, hRad6-hRad18-al, hMms2-hUbc13-mal kialakított fehérje-fehérje interakcióit GST (glutathion *S*-transzferáz) pull down módszerrel vizsgáltuk¹²⁷. A kísérleteinkhez a HLTF, SHPRH, hRad6-hRad18, hMms2, hUbc13 és a hPCNA fehérjéket N-terminális GST-tag-el fúzióban BJ5464 vakuoláris proteáz hiányos élesztő törzsben termeltük, majd tisztítottuk. A Rad6 esetében hRad6A-t használtuk. A tisztítás glutation-szefaróz gyöngyön történt, amelyről a HLTF-et és az SHPRH-t glutationnal eluáltuk, míg a hRad6-hRad18, hMms2, hUbc13 és a hPCNA fehérjékről a GST tag-et Pre-Scission proteázzal hasítottuk a GST tag és a fehérje között lévő Pre-Scission proteáz hasító hely segítségével. Az így tisztított fehérjéket megfuttattuk, hogy a preparátumok tisztaságát, illetve a Pre-Scission proteáz hasítás hatékonyságát ellenőrizzük (11. ábra, A panel, 12. ábra A panel).



11. ábra: A HLTF *in vitro* asszociációja a hRad6-hRad18 és hMms2-hUbc13 komplexekkel.

A: Az *in vitro* interakciós kísérletekhez tisztított fehérjék ellenőrzése. A fehérje mintákból 1 µg-ot 12%-os SDS poliakrilamid gél-en megfuttattunk, majd Comassie Blue festékekkel megfestettük. 1: Molekulasúly marker, 2: GST-HLTF, 3: Rad6-Rad18 komplex, 4: Mms2-Ubc13 komplex.

B: GST pull down kísérlet HLTF és Rad6-Rad18 illetve HLTF és Mms2-Ubc13 komplexekkel. 10 µg GST-HLTF-et glutathion szefaróz gyöngyre kötöttünk, majd Rad6-Rad18 (7.5 µg) és Mms2-Ubc13 (6 µg) komplexekkel inkubáltuk. Mosás után a fehérje komplexeket glutationnal eluáltuk. L: fehérje minta összetétele a gyöngyhez adás előtt. F: átfolyó frakció, W: mosó frakció, E: eluált fehérjék. A 6-9 minták a kontroll kísérlet eredményét mutatják, ahol GST-HLTF helyett GST-t kötöttünk a gyöngyhez.



12. ábra: Az SHPRH *in vitro* asszociációja a hRad6-hRad18 és hMms2-hUbc13 komplexekkel

A: Az *in vitro* interakciós kísérletekhez tisztított fehérjék ellenőrzése. A fehérjékből 1 µg-ot 12%-os SDS poliakrilamid gél-en megfuttattunk, majd Comassie Blue-val megfestettük.

1: Molekulasúly marker, 2: GST-SHPRH, 3: Rad6-Rad18 komplex, 4: Mms2-Ubc13 komplex.

B: GST pull down kísérlet SHPRH és Rad6-Rad18 illetve SHPRH és Mms2-Ubc13 komplexekkel. 10 µg GST-SHPRH-t GST gyöngyre kötöttünk, majd Rad6-Rad18 (7.5 µg) és Mms2-Ubc13 (6 µg) komplexekkel inkubáltuk. Mosás után a fehérje komplexeket glutationnal eluáltuk. L: fehérje minta a gyöngyhez adás előtt, F: átfolyó frakció, W: mosó frakció, E: eluált fehérjék. A 6-9 minták a kontroll kísérlet eredményét mutatják, ahol GST-SHPRH helyett GST-t kötöttünk a gyöngyhez.

Ezután a HLTF és az SHPRH glutationnal eluált fehérje oldatából a glutationt dialízissal eltávolítottuk, majd a HLTF-et és az SHPRH-t újra felkötöttük a glutation-szefaróz gyöngyre. Az immobilizált fehérjékhez hozzáadtuk a Pre-Scission proteázzal hasított hRad6-hRad18, hMms2-hUbc13 és hPCNA fehérjéket, majd inkubálás után a gyöngyre kötődött komplexeket glutationnal eluáltuk. A 11. B illetve 12. B ábrákon megfigyelhető a hRad6-hRad18 és a hMms2-hUbc13 komplexek együttes elúciója a GST-HLTF-fel és a GST-SHPRH-val, ami a köztük lévő közvetlen kölcsönhatásra utal. A hPCNA-val nem figyeltünk meg koelúciót. Ezen koelúciók specifikusságát a kísérletekben kontrollként immobilizált GST-t használva bizonyítottuk (11. B és 12 B. ábrák).

Az *in vivo* és *in vitro* fehérje interakciós kísérleteink eredményei szerint a HLTF és az SHPRH közvetlen kölcsönhat a hRad6-hRad18 és az hMms2-hUbc13 komplexekkel, azokkal

egy több alegységes, stabil fehérje komplexet alkotnak, utalva a HLTF, SHPRH és a Rad5 között fennálló funkcionális homológiára.

A PCNA-val kapott pozitív koimmunoprecipitációs és a direkt kölcsönhatást vizsgáló negatív *in vitro* kísérleti eredmények ellentétesek, amely utalhat arra, hogy a PCNA-val *in vivo* e két fehérje komplexet képez ugyan, de a köztük lévő kapcsolatot vagy egy harmadik fehérje vagy DNS mediálja. Másik lehetséges magyarázat, hogy ezen fehérjék emberi sejtekben a PCNA egy poszttranszlációs módosítást hordozó formájával lépnek interakcióba, amely az élesztő sejtekből tisztított PCNA-n nincs jelen. E kérdés tisztázása jelenleg folyamatban van laboratóriumunkban.

6.4 A HLTF és az SHPRH stimulálja a PCNA poliubikvitilációját

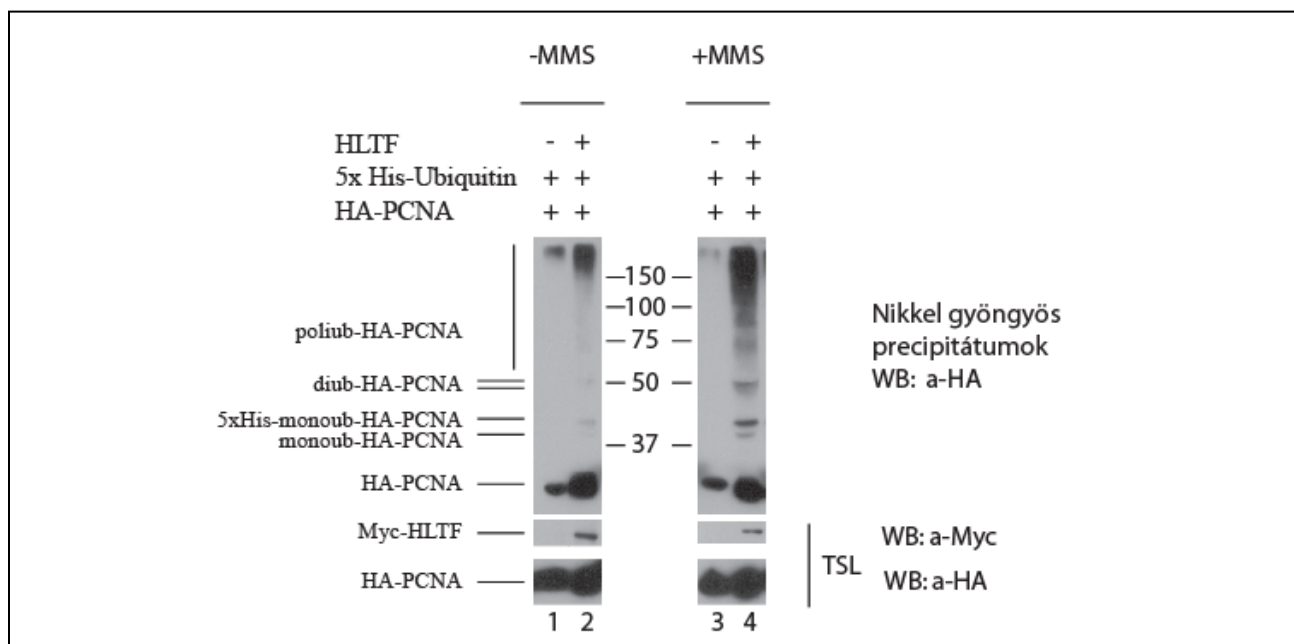
Élesztőben DNS-károsodás hatására a Rad6-Rad18 monoubikvitinálja a PCNA-t a 164. pozícióban lévő lizinen, majd a Rad5 - az Mms2-Ubc13 ubiquitin ligáz komplex-szel együttműködve - poliubikvitin láncot épít a monoubikvitilált PCNA-re az ubiquitin 63-as pozícióban lévő lizinjén keresztül. Az előzőekben bemutatott interakciós kísérleti eredmények alapján feltételeztük, hogy mind a HLTF, mind az SHPRH a Rad5-höz hasonlóan a Rad6-Rad18 és az Mms2-Ubc13 ubiquitin ligáz komplexekkel több alegységes komplexet alkotva ubiquitin ligázként működik emberi sejtekben, amelyek egyik lehetséges szubsztrátja a PCNA. Ezen hipotézist *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerekben is ellenőriztük.

6.4.1 A PCNA poliubikvitiláció stimulálásának vizsgálata *in vivo* kísérleti rendszerben

Az *in vivo* poliubikvitilálási kísérletben 6Myc tag-el jelölt HLTF-et, HA-PCNA és 5xHis-ubikvitint termelő plazmid konstrukciókat transzfektáltunk HEK293FT sejtekbe, majd a transzfekciót követő napon a sejteket ketté osztottuk. A transzfekció után 48 óra elteltével a minták felét DNS károsító szerrel, 0.02% MMS-el (Metil-metán-szulfonát) kezeltük. A kezelés után 4 órával mind a kezeletlen, mind a kezelt sejteket feltártuk, majd az ubikvitilált fehérjéket az 5xHis-ubikvitinen keresztül nikkel gyöngyökhöz kötöttük. A precipitátumokban anti-HA ellenanyaggal ellenőriztük a HA-PCNA ubikvitilált formáinak jelenlétét. Megfigyeltük, hogy nemcsak a PCNA poliubikvitilációja erősödik HLTF túltermelése esetén, hanem a

monoubikvitilált PCNA mennyisége is megnő (Rad18 overexpresszió hiányában is) (13. ábra, 2. minta). Ennek oka lehet, hogy a Rad6-Rad18 HLTF-el komplexet képezve aktívabb, mint nélküle. Esetleg, a HLTF és egy deubikvitináló enzim, USP1¹²⁸ (*Ubiquitin Specific Peptidase 1*) deubikvitiláló enzim kompetál a monoubikvitilált PCNA-ért, e versengés során a túltermelt HLTF kerül előnybe, így a deubikvitiláció mértéke kisebb.

A HLTF jelentősen stimulálta a PCNA poliubikvitilálását is (13. ábra, 1-2. minták). Az MMS kezelés mind a mono-, mind a poliubikvitilációt erősítette (13. ábra, 3-4. minták).



13 ábra: A HLTF stimulálja a PCNA poliubikvitilálását humán sejtekben.

HEK293FT sejteket HA-PCNA-t, 5xHis-ubikvitin-t, Myc-HLTF-et kifejező plazmidokkal transzfektáltak. A transzfekció után 48 órával a sejtek felét MMS-el kezeltük. 4 órával az MMS kezelés után a sejteket feltártuk (TSL-teljes sejtlizátum), majd a lizátumokból az ubikvitilált fehérjéket nikkel gyöngyre kötöttük. A kötődött fehérjék között az ubikvitilált PCNA formák jelenlétét anti-HA ellenanyaggal ellenőriztük western blott (WB) segítségével.

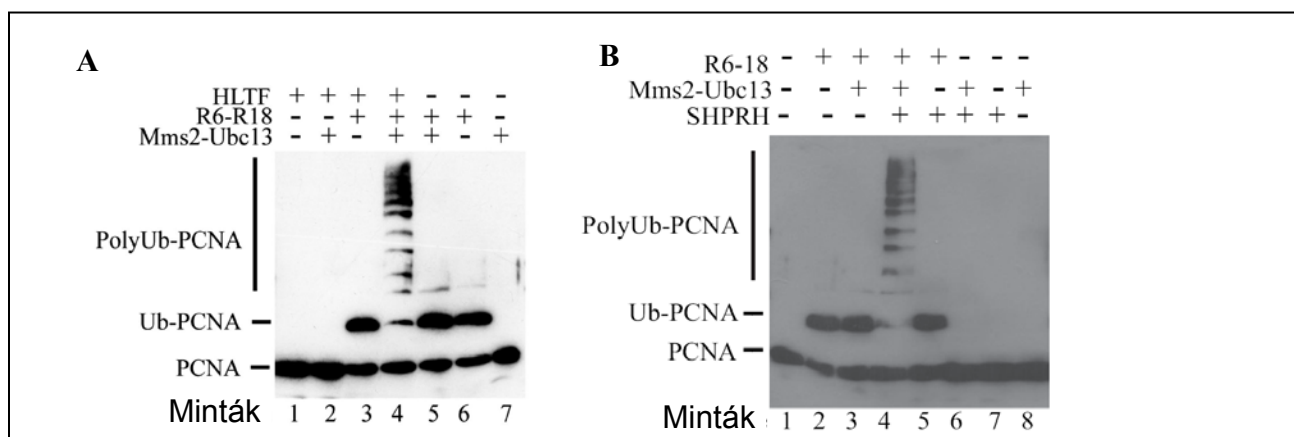
Megjegyzendő, hogy a precipitátumokban az ubikvitilált PCNA formák mellett a nem ubikvitilált PCNA-t is megfigyeltük feltehetően azért, mert a nem ubikvitilált formát is precipitáltuk a PCNA trimer gyűrű egy ubikvitilált tagján keresztül. Ez azt jelenti, hogy egy PCNA trimer egyszerre hordozhat ubikvitilált és nem ubikvitilált monomereket is.

Az SHPRH-ról közben megjelent egy közlemény, amely megerősíti eredményeinket ¹²⁹. Akira Motegi és munkatársai, hogy *in vivo*, emlős sejtekben az SHPRH a Rad6-Rad18 és az Mms2-Ubc13 komplexekkel együttműködve poliubikvitinálja a PCNA-t és, hogy a poliubikvitilált PCNA mennyisége MMS kezelés hatására nő ¹²⁹.

A HLTF és az SHPRH ubikvitin ligáz aktivitását *in vitro*, tisztított fehérjéket használva tovább jellemeztük.

6.4.2 A PCNA poliubikvitiláció stimulálásának vizsgálata *in vitro* kísérleti rendszerben

A PCNA-t előinkubáltuk RFC-vel és DNS-el, lehetővé téve, hogy a PCNA-t az RFC felrakja a DNS-re. A DNS-re töltött PCNA-hoz ubikvitint, Uba1 (ubikvitin aktiváló enzim), hRad6-hRad18, hMms2-hUbc13 HLTF és SHPRH különböző kombinációit adtuk. Az ubikvitilálás folyamatát anti-PCNA ellenanyaggal követtük nyomon. Kísérletünkben a hRad6-hRad18 monoubikvitilálta a PCNA-t (14. ábra, A panel 6. sor, B panel 2. sor). A hMms2-hUbc13 további hozzáadása a reakcióhoz nem befolyásolta az ubikvitilációt (14. ábra, A panel 5.sor, B panel 3. sor).



14. ábra. A HLTF és az SHPRH stimulálja a PCNA poliubikvitilálását *in vitro*. PCNA-t inkubáltunk Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13 HLTF és SHPRH különböző kombinációival. Az ubikvitilálási reakciókat megfuttattuk, majd blottoltuk. A PCNA-t és ubikvitilált formáit anti-PCNA ellenanyaggal detektáltuk.

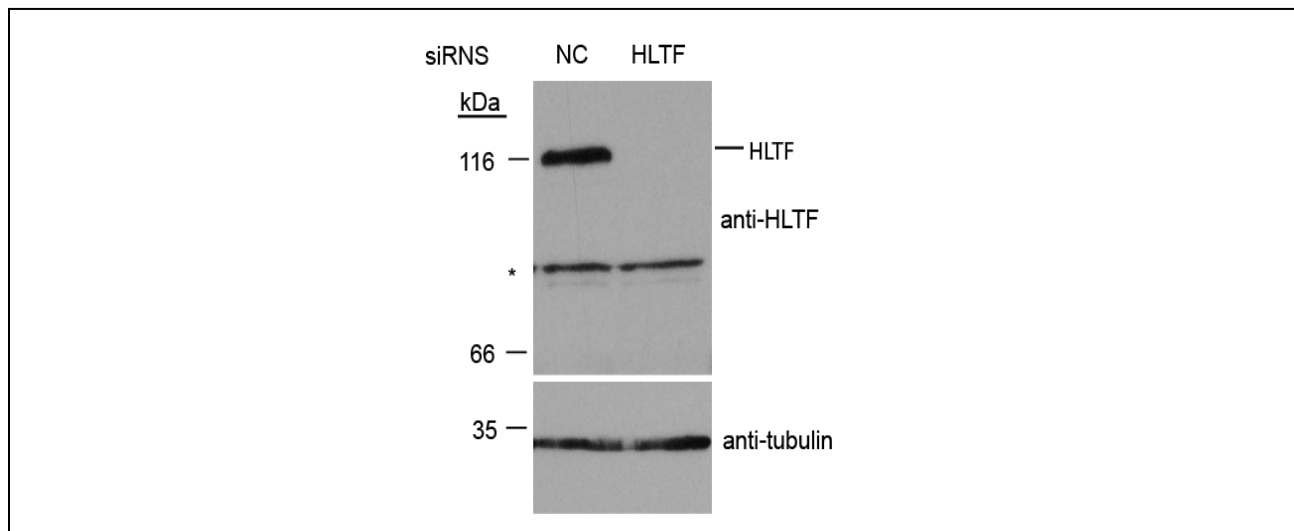
Ha azonban a Rad6-Rad18 és az Mms2-Ubc13 mellett HLTF-et vagy SHPRH-t adtunk a reakcióhoz, a PCNA-n poliubikvitin lánc alakult ki, ahol majdnem az összes monoubikvilitált PCNA forma poliubikvilitálttá alakult át (14. ábra, A panel 4. sor, B panel 4. sor) A HLTF vagy az SHPRH önmagukban (14. ábra, A panel, 1. sor, B panel 7. sor) vagy a hRad6-hRad18-al de hMms2-hUbc13 nélkül (14. ábra, A panel, 3. sor, B panel 5. sor) nem stimuláltak a poliubikvitin lánc kialakulását, sem hMms2-hUbc13 jelenlétében de hRad6-hRad18 nélkül (14. ábra, A panel, 2. sor, B panel 6. sor).

Ezen eredmények szerint, *in vitro* rendszerben a HLTF és az SHPRH ubikvitin ligázként a Rad6-Rad18 és Mms2-Ubc13 komplexekkel együtt működve poliubiquitilálja a PCNA-t. A HLTF és az SHPRH ezen aktivitása a Rad5-tel való funkcionális homológiájukat mutatja.

6.5 A HLTF hatása a károsodott DNS replikációjára

Csoportunk eredményei szerint, *in vitro* rendszerben a HLTF a Rad5-höz hasonló “replikációs villa megfordító” aktivitással rendelkezik (nem publikált eredmények). Ezen kísérleti eredmények ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy *in vivo* a HLTF milyen hatással van a replikációs villa előrehaladására.

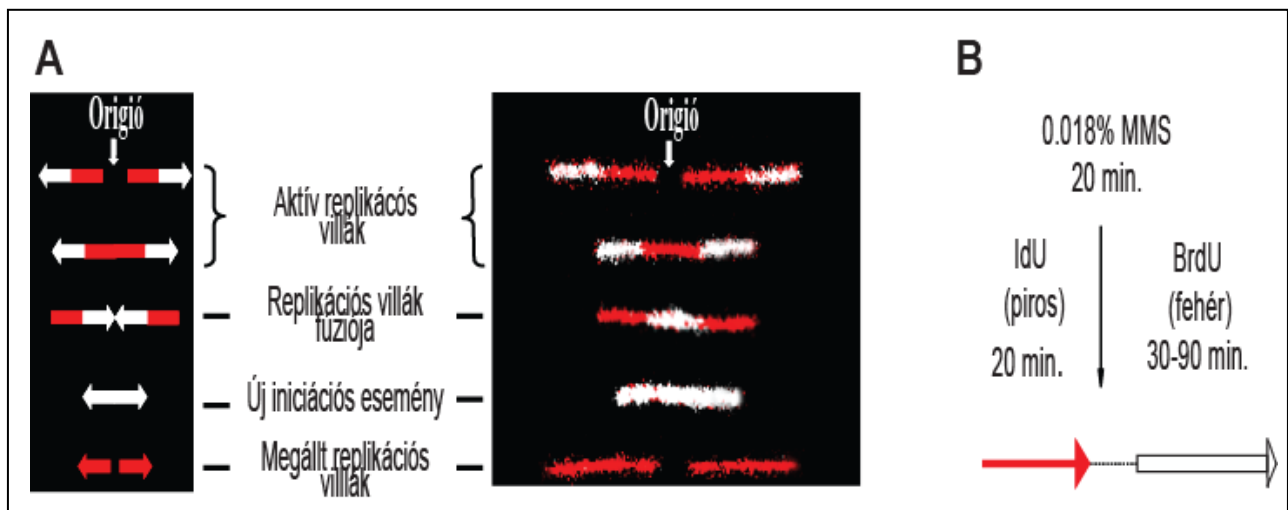
A HLTF replikációs villára gyakorolt hatását siRNS-el történő csendesítés előidézésével vizsgáltuk. Kísérletünkben HLTF és negatív kontroll (NC) siRNS-el kezelt HeLa sejteket használtunk. A HLTF siRNS-el kezelt sejtekben a HLTF expresszióját csendesítettük. A csendesítés mértéket mutatja a 15. ábra. A kontroll kísérletben olyan siRNS-t alkalmaztunk (NC siRNS), amely nem csendesíti specifikusan egyetlen fehérje expresszióját sem. A kísérletekben a replikációs villákat a DNS fiber módszerrel tettük láthatóvá ¹²¹. Különböző halogenizált nukleotid analógokkal pulzus jelöljük a sejteket, majd a beépülés helyét izolált, kinyújtott DNS szálaikon a nukleotid analógoknak megfelelő ellenanyagokkal tesszük láthatóvá. Ha a pulzus jelölés során, két különböző nukleotid analógot egymás után alkalmazunk, azok egymás utáni beépülése egyértelműen megjelöli az aktív replikonokat. (16. ábra, A panel)



15. ábra. *HLTF siRNA-sel való csendesítésének hatékonysága.*

NC-negatív kontroll siRNA, HLTF-HLTF siRNA, *: aspecifikus jel

A HLTF siRNA-sal és a NC siRNA-sal kezelt sejteket pulzus jelöltük IdU-val (iodo-deoxyuridine), majd a nukleotid analóg eltávolítása után 20 perces 0.018% MMS kezeléssel károsítottuk a sejtekben lévő DNS-t. MMS kezelés után az MMS-t alaposan lemostuk a sejtekről és az IdU-hoz képest 10-szer nagyobb mennyiségű BrdU-val újra pulzus jelölést végeztünk. (A 10-szeres BrdU koncentrációval biztosítjuk, hogy az első jelölés után a sejtekben maradt IdU helyett nagyobb valószínűséggel a BrdU kerüljön beépítésre). Ezzel párhuzamosan MMS-sel nem kezelt mintát is vizsgáltunk, ahol a sejteket 20 percig jelöltük IdU-val, majd 30 percig BrdU-val (16. ábra, B panel). Az MMS-el kezelt sejtekből a kettős jelölés után különböző időpontokban mintát vettünk és elvégeztük a DNS fiber analízist. A IdU beépülését mindkét nukleotid analógot felismerő, egér anti-IdU/BrdU elsődleges ellenanyaggal, és anti-egér Cy3 konjugált másodlagos ellenanyaggal (16. A és 17. ábrán piros), illetve a BrdU beépülést, BrdU-ra specifikus patkány anti-BrdU és anti-patkány Alexa633 konjugált (16. A és 17. ábrán fehér) ellenanyagok kombinációjával tettük láthatóvá. Megszámoltuk a különböző időpontokban vett mintákban a megállt (csak piros festődést mutató) illetve az aktív, előre haladó (piros és fehér festődést mutató) replikációs villákat, majd az eredményeket grafikonon ábrázoltuk (18. ábra, A).

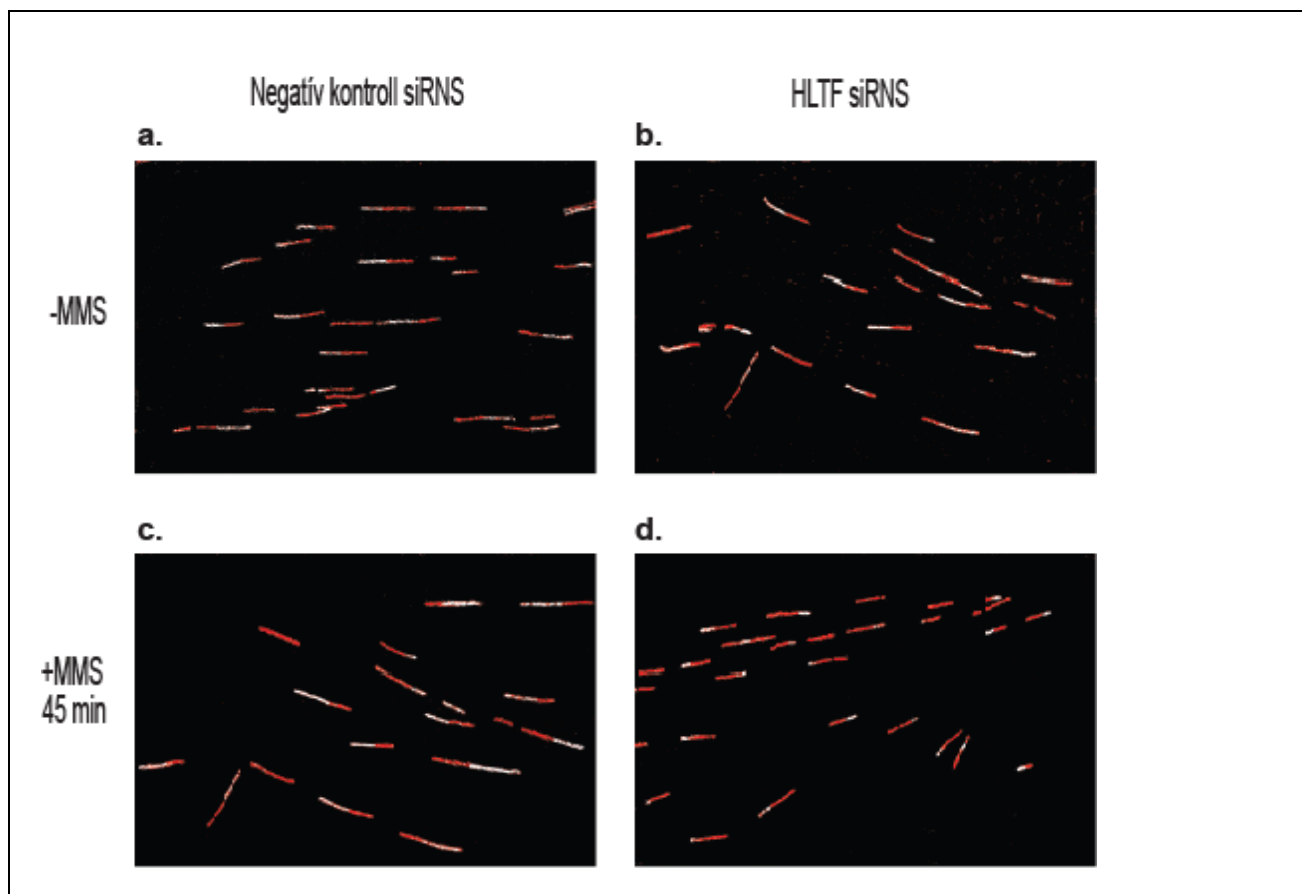


16. ábra. A DNS fiber kísérleti rendszer bemutatása

A: A DNS fiber módszerrel megfigyelhető replikációs struktúrák. 1: Mindkét jelölés alatt aktív replikációs villák, 2: Terminális fúziók, 3: Második jelölés alatti iniciációs esemény, 4: Az első jelölés alatt befejeződött replikáció.

B: A kísérlet menete. 20 perces IdU jelölés után IdU-t eltávolítottuk, majd 30 percen keresztül MMS-el kezeltük a sejteket. Az MMS eltávolítása után a sejteket különböző ideig BrdU-val jelöltük, majd a DNS-t tárgylemezen kinyújtottuk. Az első jelölés (IdU), kijelöli a károsodás előtt aktív replikációs villákat, míg a második jelölés (BrdU) lehetővé teszi ezen replikációs villák viselkedésének vizsgálatát MMS kezelés hatására.

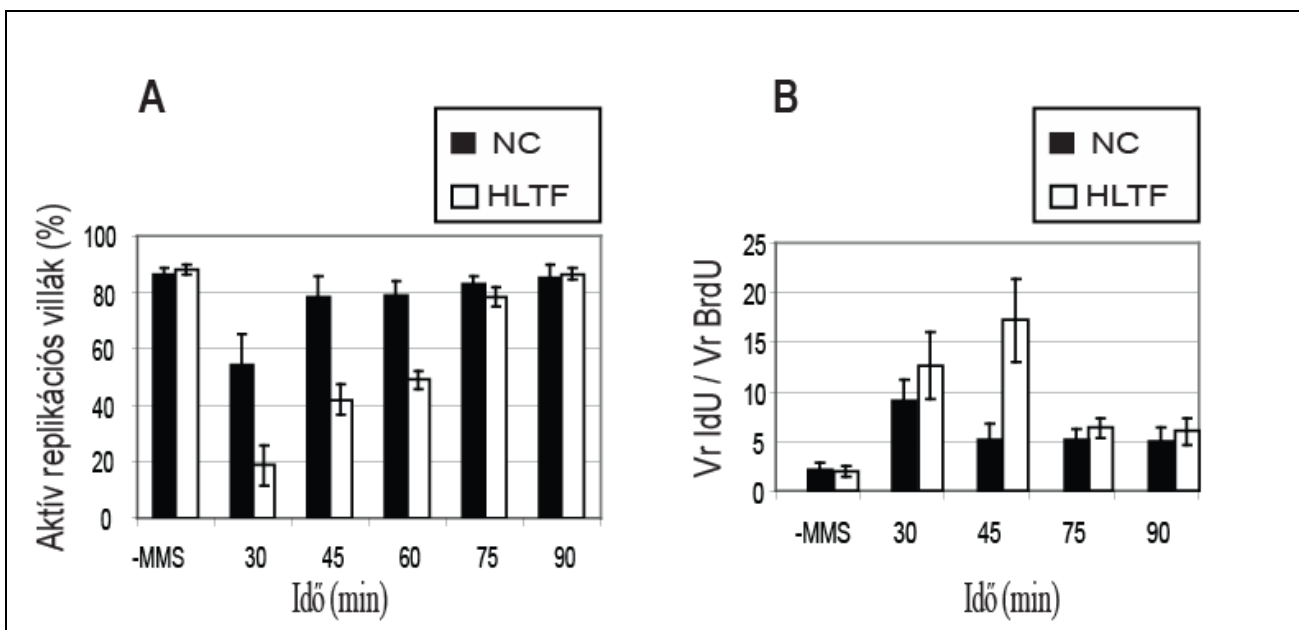
MMS kezelés nélkül nem kaptunk érdemi különbséget a két minta között. Mind a HLTf-, mind a NC siRNS-el kezelt minták esetében a replikációs villák ~90%-ában mindkét nukleotid analóg beépült, jelezve, hogy ezekben a replikációs villákban a kettős jelölés ideje alatt folyamatosan aktív volt a DNS szintézis (18. ábra, A -MMS oszlopai, illetve 17. ábra a, b képek). A jelölt villák ~10%-ában csak az első pulzus jelölés során alkalmazott nukleotid analóg (IdU) épült be. Ezen 10% azon replikációs villákat reprezentálja együttesen, ahol az első jelölés során a szintézis a végéhez ért és befejeződött, illetve azokat ahol az első jelölés közben a replikációs villa DNS hibához érve megakadt és a replikáció nem folytatódott a második jelölés időtartama alatt sem.



17. ábra. *A DNS fiber-ek mikroszkópos képe*

a. Negatív kontroll siRNA-sal kezelt minta, MMS kezelés nélkül. b. HLTF siRNA-sal kezelt minta MMS kezelés nélkül. c. Negatív kontroll siRNA-sal kezelt minta, 45 percet az MMS kezelés után. d. HLTF siRNA-sal kezelt minta, 45 percet az MMS kezelés után.

Az MMS kezelés mindkét mintában jelentősen csökkentette a replikációs aktivitást. A negatív kontroll siRNA-sal kezelt sejtekben, 30 perccel az MMS kezelést követően számos az MMS kezelés előtt aktív replikációs villa megállt, BrdU beépülést nem mutatott. A NC siRNA-sal kezelt sejtek esetében az aktív replikációs villák száma közel 50%-ra csökkent, míg a HLTF siRNA-sal kezelt mintákban 20%-ra. 40-60 perc elteltével HLTF hiányában a megakadt replikációs villáknak csak néhány százaléka nyerte vissza a replikációs aktivitást, míg a negatív kontrollal kezelt mintákban 60 perc elteltével a villák több mint 80%-a aktívnek mutatkozott. Az MMS kezelést követő 75-90 perc során mind a HLTF mind a negatív kontroll siRNA-sal kezelt sejtekben helyreállt az aktív replikációs villák száma a kiindulási állapotra (18. ábra, A).



18. ábra: A HLTF részt vesz a DNS-károsodás okozta replikációs blokk feloldásában, segíti a villák előrehaladását.

A: Az MMS kezelés hatására blokkolt és az MMS kezelés ellenére továbbhaladó replikációs villák számának összehasonlítása HLTF és NC siRNS-el kezelt sejtekben. A statisztikát időpontként 150 replikációs villa megszámolása alapján készítettük.

B: MMS kezelés után továbbhaladó replikációs villák MMS kezelés előtti (Vr IdU) és utáni (Vr BrdU) átlagsebességének (kb/min) összehasonlítása HLTF- és NC siRNS-el kezelt mintákban. 150 replikációs villát mértünk meg minden jelzett időpontban.

A replikációs villák egy része az MMS kezelés után is mindkét mintában aktív maradt, a BrdU beépülés detektálható volt. Meghatároztuk a replikáció MMS kezelés előtti (Vr IdU, kilobázis/perc) és utáni (Vr BrdU, kilobázis/perc) átlagsebességét ezen replikációs villákban. Szembetűnő különbséget figyeltünk meg a replikáció sebességében MMS kezelés előtt és után NC és HLTF siRNS-el kezelt mintákban is. A replikációs sebesség azonban drasztikusan csökkent HLTF hiányában. Míg a NC kontroll siRNS-sel kezelt sejtekben 45 perccel MMS kezelés után az átlagsebesség ötöde volt a kezelés előttinek, addig a HLTF siRNS-el kezelt mintákban a replikációs ráta 16-szor kisebbnek mutatkozott mint a kezelés előtt. (18. B ábra, 17. ábra c, d képek)

A DNS fiber kísérlet eredményei szerint HLTF-nek jelentős szerepe van a DNS-károsodás hatására megállt replikációs villák újraindulásában illetve a normál replikációs ráta fenntartásában. A HLTF hiányában a DNS hiba okozta replikációs blokk feloldása időben

elhúzódik, a zavartalan állapotra jellemző replikációs ráta helyreállítása hosszabb időt vesz igénybe.

7 Eredmények megvitatása

A HLTF (*Helicase like transcription factor*) és az SHPRH (*SNF2 histone linker PHD RING helicase*) fehérjéket mint az élesztő Rad5 DNS károsodás tolerancia útvonalban szerepet játszó fehérje strukturális és funkcionális emberi megfelelőit azonosítottuk.

A HLTF részlegesen menekíti - *rad30* delécióval érzékenyített genetikai háttéren - a *rad5* deléciós élesztő mutáns UV érzékenységi fenotípusát, jelezve a funkcionális homológiát e két fehérje között. E megfigyelés a Rad5 által képviselt DNS hiba átírási útvonal evolúciós konzerváltságát is mutatja eukariótákban. Az SHPRH esetében nem figyeltünk meg komplementációs hatást. Míg a máig tanulmányozott, élesztőben és emberben található ubikvitin és E1 (ubikvitin aktiváló) fehérjék tökéletes komplementációt mutatnak, addig az E2 enzimek esetében az emberi fehérjék részlegesen, az ubikvitin ligázok nagy része pedig nem komplementálja az élesztő megfelelőik mutánsait. A DDT útvonalban résztvevő fehérjék közül a humán Mms2 ubikvitin konjugáló fehérje is csak részlegesen komplementálja az élesztő Mms2 deléciós mutáns DNS-károsodásra mutatott érzékenységét, míg az emberi Rad18 fehérje nem komplementálja az élesztő Rad18 mutáns UV érzékenységi fenotípusát^{130,131}. Ennek oka lehet, hogy az élesztő ubikvitin aktiváló enzimek magas homológiát mutatnak az emberiekkel, az ubikvitin konjugálóak kisebbet míg a legalacsonyabb mértékű homológiát az ubikvitin ligázoknál figyelhetjük meg. A Rad5, a HLTF és az SHPRH RING finger doménnel rendelkező E3 ubikvitin ligázok. A RING finger doménben mutáns Rad5 expressziója Rad5 deléciós háttéren csak részlegesen menekíti a Rad5 mutáns UV érzékenységi fenotípusát, jelezve, hogy a fehérje ubikvitin ligáz aktivitásának fontos szerepe van az UV sugárzás indukálta DNS-károsodás tolerálásában. Az érzékenyített háttéren HLTF-el kapott részleges komplementáció így erős bizonyítéknak tekinthető a HLTF és a Rad5 között fennálló funkcionális homológia tekintetében, az SHPRH-val kapott negatív eredmény pedig nem zárja ki a fehérjék között feltételezhető funkcionális homológiát.

Élesztőben a Rad5 fehérje stabil komplexet formál a Rad18-al és az Ubc13-mal. A Rad18-al a Rad5 N-terminális része lép interakcióba, míg az Ubc13-mal a RING finger doménen keresztül alakít ki kölcsönhatást. A fehérje két különböző részére térképezett interakciós régiók lehetővé teszik, hogy a Rad5 egy időben a Rad18-hoz és az Ubc13-hoz is kapcsolódjon; ezáltal

koordináló hídként szolgálhat egy multimer ubikvitin ligáz komplex kialakításában^{103,104}. Megfigyeltük, hogy *in vitro*, tisztított formában a HLTF és az SHPRH is stabil komplexet alkot Rad6-Rad18-al és Mms2-Ubc13-mal. Továbbá a HLTF koprecipitálható Rad18-al, Ubc13-mal, Mms2-vel és PCNA-val, az SHPRH pedig Ubc13-mal emberi sejtekből. Emellett Akira Motegi és munkatársai megfigyelték az SHPRH koprecipitációját emberi sejtekből Rad18-al, Mms2-vel és PCNA-val¹²⁹. Az *in vitro* és *in vivo* fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálatok szerint biztosan mondhatjuk, hogy a Rad5 fehérjéhez hasonlóan a HLTF komplexet formál a Rad6-Rad18-al és az Mms2-Ubc13-mal míg az SHPRH Ubc13-mal. Ezen interakciók térképezése, funkciójuk vizsgálata a későbbiekben mélyebb betekintést nyújthat a DNS-károsodás okozta PCNA mono- és poliubikvitilálás folyamatába.

A HLTF és az SHPRH a Rad6-Rad18 és az Mms2-Ubc13 komplexekkel együttműködve poliubiquitilálja a PCNA-t mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérleti rendszerekben. Csoportunkban az SHPRH-val és a HLTF-el elvégzett, publikált kísérleti eredményekből, illetve az eredményeinket megerősítő, párhuzamosan megjelent tanulmányból tudjuk, hogy a poliubikvitilálás a Rad5 fehérjére jellemző módon történik. Az SHPRH és a HLTF mind *in vitro*, mind *in vivo* a PCNA 164-es lizinjére építenek az ubikvitin K63-as lizinjén keresztül kialakított poliubikvitin láncot^{129,132}.

Ezenfelül megfigyeltük, hogy *in vivo*, a HLTF segíti a DNS-károsodás következtében megállt replikációs villák továbbhaladását. A HLTF e hatása véd a DNS-károsodás következtében megállt replikációs villa összeomlásától, kettős szálú törések kialakulásától, illetve a genomikus instabilitástól.

A DNS hiba átírás folyamatának genetikai tanulmányozása elsősorban élesztőben történt, ahol a Rad5 deléciós inaktiválása rendkívül érzékenyvé teszi a sejteket a DNS károsító hatásokra. Itt a Rad5 szerepe a hibamentes átírásban elengedhetetlen. A Rad5 ATP-áz illetve RING domén mutánsai is hasonló mértékű hibát mutatnak a DNS hiba átírás hatékonyságát mérő kísérleti rendszerben, mint a Rad5 hiányos mutáns. Tehát mind az ATP-áz, mind az ubikvitin ligáz aktivitás elengedhetetlen a Rad5 DNS hiba átírásban betöltött funkciójához⁹⁹. Csoportunk eredményei szerint a Rad5 a replikáció során az ATP-áz/helikáz doménje révén képes szétválasztani az új szálát a templáttól, majd a komplementer újonnan szintetizálódó szállal összeolvasztani azt, így lehetőséget biztosít arra, hogy a replikációs polimeráz az újonnan szintetizált szálát használja egy átmeneti szakaszon a replikáció templátjául. Amennyiben a

replikatív polimeráz egy DNS hibánál megáll, a szintézist tovább folytathatja a Rad5 villa megfordító aktivitásának köszönhetően, amely során a replikatív polimeráz a hibás DNS szakaszon az információt az ép, újonnan szintetizálódott komplementer szárról másolja⁹². Ez a Rad5 függő DNS hiba átírási folyamat hibamentes átírást eredményez. Élesztőben a Rad5 SWI/SNF ATP-áz aktivitása mellett az ubikvitin ligáz funkciójára is szükség van a DDT folyamatokban. A PCNA Rad5 és Mms2-Ubc13 függő poliubikvitilálása elengedhetetlen a templát váltó folyamatok létrejöttéhez. Sem rekombinációs hibajavítás, sem a replikációs villa visszafordításán alapuló folyamatok nem működnek a *rad5Δ*, az *mms2Δ* és a PCNA K164R mutációt hordozó törzsekben. A Rad5 és az Mms2-Ubc13 komplex a hibamentes átírás biztosítása mellett védi a sejteket a mutagenézistől. Ha élesztő sejtekben a Rad5-öt, az Mms2-t vagy az Ubc13-at inaktíváljuk, a DNS károsító hatásokra a mutagenézis megnő⁵⁸. E sejtekben a Rad5 függő hibajavítás inaktíválása következtében megnövekszik a TLS aktivitás, ahol a mutációk kialakításáért felelős polimeráz ζ és Rev1 végzi a villa menekítését. Így tehát a PCNA Rad5 függő poliubikvitilálása védelmet biztosít a mutagenézissel szemben, gátolva a mutagén átírást biztosító TLS polimerázokat, illetve utat engedve a Rad5 mutáció mentes átírást biztosító replikációs villa megfordító aktivitásának. Emberben is megfigyelhető a PCNA UV károsodásra bekövetkező, Ubc13 függő poliubikvitilálása⁹⁸. Emellett az Mms2 siRNS-el való csendesítése illetve a K63 ubikvitin lánc kialakulásának gátlása megnöveli a DNS-károsodás indukálta, TLS-en alapuló mutagenézist^{98,133}, így mind élesztő, mind emberi sejtekben a Rad5 az Mms2-Ubc13-mal együtt fontos szerepet játszik a mutagenézis elleni védelemben.

A DNS károsító hatásokat kiküszöbölő folyamatok rendkívül konzerváltak. A DNS hiba átírás élesztőben tanulmányozott génjeit emberben is azonosították. Emberben azonban a Rad6-Rad18 csoport összetettebb. Az e csoportba tartozó élesztő géneknek több emberi ortológja is kialakult. Így például emberben két Rad6 fehérjét (Rad6A, Rad6B) és több Rad30 homológot, Polι-t, Polκ-t, Polη-t azonosítottak¹³⁴. Az élesztő Rad5 génnek is legalább két emberi ortológja van. A HLTF és az SHPRH fehérjéket mind nagyfokú aminosav szekvencia hasonlóságuk, mind domén struktúrájuk alapján a Rad5 homológjainak tekinthetjük. Mindkét fehérjében a konzervált helikáz motívumok közé ékelődve található a RING domén. Ez az elrendeződés kivételes az eukarióta fehérjék között. Ezen felül a HLTF és a Rad5 fehérjék N-terminális részét egy úgynevezett HIRAN domén gazdagítja, amely funkciója jelenleg nem ismert; predikciók DNS

hiba felismerő aktivitást társítanak hozzá ¹²³. A HIRAN domén hiányzik az SHPRH-ból, így a HLTF-et szerkezete alapján a Rad5 közelebbi homológjának tekinthetjük ¹³².

Számos megelőző tanulmány szól a HLTF transzkripcióban betöltött szerepéről. A HLTF kötődik a PAI-1 promóterhez és aktiválja azt ¹⁰⁸. Emellett az SV40, illetve a miozin könnyű lánc promóterekhez, valamint a HIV hosszú terminális ismétlődéseihez is specifikus kötést mutat ¹³⁵. Ezen DNS kötő tulajdonságért a 125-220 aminosavig terjedő régió a felelős. Emberben a HLTF-nek két transzkripciós variánsa fordul elő. A rövidebb formából hiányzik az első 120 aminosav, amely tartalmazza a HIRAN domén szekvencia elemeit. Ezen izoforma az, ami transzkripciós faktor aktivitást, illetve specifikus DNS kötő tulajdonságokat mutat ¹⁰⁹, így a HIRAN domén nem játszik szerepet a HLTF-nek a génkifejeződést szabályozó elemekhez való specifikus kötődésében. Érdekes kérdés, hogy vajon a HIRAN doménnek a Rad5 és a HLTF DNS hibajavító funkciójában lehet-e szerepe.

A Rad5 hibamentes átírást támogató, replikációs villa megfordító, mutagenesis ellen védő és a PCNA poliubikvitináló aktivitásai együttesen előrevetítik, hogy emberi paralógjai is a mutációk kialakulása elleni védelemben játszanak szerepet. Különböző rákos emberi sejtvonalakban, melanómákban, mellrák és petefészekrák sejtvonalakban heterozigócia elvesztését figyelték meg a 6q24-q27 kromoszóma régióban, ahol az SHPRH gén található ¹¹¹. Ezen felül egy tanulmány 44 melanóma és petefészekrák sejtvonalban négy olyan pontmutációt azonosított az SHPRH génben, amelyek egészséges sejtekben nem fordulnak elő ¹¹¹. Ezek közül hármat hemizigóta és homozigóta állapotban figyeltek meg, amely a funkcionális SHPRH teljes hiányát jelzi ezekben a sejtvonalakban. A HLTF tumorszupresszor szerepére számos tanulmány rámutat. Ezek szerint a HLTF expressziója gyomor és bél traktusból származó rákos sejtvonalak 50%-ban gátolt, promóterének hipermetiláltsága következtében ^{136,124,137,138}.

Mi lehet a biológiai és klinikai jelentősége a PCNA HLTF és SHPRH függő poliubikvitilálásnak?

A K63-as lizin kapcsolatokon keresztül felépülő poliubikvitin lánc szubsztrátja a K164-es pozícióban monoubikvitilált PCNA. Elképzelhető, hogy a poliubikvitilálás egy molekuláris kapcsoló mechanizmus, amely vagy eltávolítja a TLS útvonalban működő fehérjéket a replikációs villából, és/vagy a templát váltó folyamatban résztvevő fehérjéket irányítja oda. Egy 2008-ban megjelent tanulmány szerint a Rap80 (*Receptor associated protein 80*), egy ubikvitin kötő domént tartalmazó fehérje, amely preferenciálisan kapcsolódik a kettős szálú törések

következtében kialakuló K63-as poliubikvitin lánchoz, amellyel elősegíti a dupla szálú töréseket javító rendszer fehérjéinek kötődését¹³⁹. Feltételezhető, hogy egy ehhez hasonló folyamat segíti elő a templát váltó folyamatok fehérjéinek a replikációs villánál való találkozását. A PCNA poliubikvitilálás lehet egyszerűen egy jel, amely addig jelöli meg a megállt replikációs villákat amíg a megfelelő DNS hiba átíró mechanizmus átírja a léziókat.

A transzléziós szintézis tumor kialakításában betöltött szerepéről vannak ismereteink^{106,107}, viszont még keveset tudunk arról, hogy a templát váltó folyamatok hogyan járulnak hozzá a karcinogenezis elleni védekezéshez. A munkánk során kapott eredményeink és a velük párhuzamos, más laboratóriumokból származó, független tanulmányok azonban egyértelműen bizonyítják, hogy az SHPRH és a HLTF tumorszupresszor fehérjék az evolúció során erősen konzervált mechanizmuson, a PCNA poliubikvitilálásán keresztül védik a sejteket a mutációk, illetve a rákos sejtekre jellemző genomikus instabilitás kialakulásától. Mindkét fehérje hozzájárulhat a rákos elfajulások kialakulásának megelőzéséhez^{129,132}.

Azon megfigyeléseink, hogy a HLTF és az SHPRH részt vesznek a DNS károsodásokat toleráló folyamatokban, kihasználható lehet a hagyományos rákgyógyszerek, vagyis a kemoterápiás szerek problémájának megoldásában. A kemoterápia célja ugyanis a tumor sejtek DNS-ének károsítása, lehetőleg úgy, hogy a normális sejtek ebből minél kevesebbet érezzenek. Némiképp ellentmondásos módon tehát sok kemoterápiás szer maga is erőteljes rákkeltő hatással bír. Ahogy arra a dolgozatban bemutatott kísérletek és a munkánkkal párhuzamosan megjelent tanulmányok rámutatnak, azokban a sejtekben ahol a HLTF és az SHPRH működésképtelenek a DNS károsodásokat toleráló rendszer hatékonysága korlátozott. E hiba az ép sejtekre nem jellemző. A jövőben a kemoterápia alkalmazhatóságának megítélésakor fel lehetne mérni, hogy az adott beteg daganatában vajon működőképes-e a HLTF és az SHPRH. Bármely daganat, amelyről kiderül, hogy benne ezek a fehérjék nem működnek, várhatóan rendkívül jól fog reagálni a kemoterápiára, mivel sejtjei - a szervezet ép szöveteivel ellentétben - különösen sebezhetőek lesznek bizonyos DNS károsító, rákellenes gyógyszerekkel szemben. Így a kemoterápiás szereknél a dózis csökkenthető lenne, amely a toxikus mellékhatások csökkentésével egyben a terápiát elviselhetőbbé tehetné.

8 Összefoglalás

Munkánk során szekvencia adatbázisok szűrésével két emberi fehérjét a HLTF-et és az SHPRH-t azonosítottuk az élesztő Rad5, DNS hiba átírásban résztvevő fehérje humán strukturális homológjaiként.

Funkcionális homológia ellenőrzésére irányuló kísérletekben bemutattuk, hogy a HLTF részlegesen menekíti az élesztő *rad5* deléciós mutáns UV érzékenységi fenotípusát.

Kimutattuk, hogy a HLTF és az SHPRH kölcsönhatásba lép a Rad5 fehérje ismert interakciós partnereinek humán homológjaival, a Rad6-Rad18-al, az Mms2-Ubc13-mal és a PCNA-val.

In vivo és *in vitro* kísérletekkel bemutattuk, hogy a HLTF és az SHPRH stimulálja a PCNA poliubikvitilálását.

Megfigyeltük, hogy a HLTF siRNS-el történő csendesítése következtében a DNS-károsodás hatására a megállt replikációs villák újraindulása hosszabb időt vesz igénybe mint HLTF jelenlétében, illetve a károsodás ellenére továbbhaladó villák átlagsebessége lelassul, az eredeti sebesség visszaállása hosszabb időt vesz igénybe.

Összegezve tehát a HLTF és az SHPRH potenciális tumor szupresszor fehérjéket az élesztő Rad5 funkcionális emberi megfelelőiként azonosítottuk. Kimutattuk, hogy az élesztőből ismert, Rad5-függő, templát váltáson alapuló DNS hiba átírás útvonala konzervált, emberben is megtalálható.

9 Magyar nyelvű összefoglaló

A sejt élete során örökítő anyagában folyamatos sérülések következtében hibák halmozódnak fel, amelyek a sejtek rákos elfajulását illetve halálát okozhatják. A károsodott DNS hatékony javítása így kulcsfontosságú feladat, mind az egysejtű, mind a többsejtű élőlények túlélése szempontjából.

A sérült bázisok egy részét hatékony DNS hibajavító rendszerek mint pl. a NER (*Nucleotide Excision Repair*), a BER (*Base Excision Repair*) eltávolítják mielőtt a sejt belépne a sejtciklus szintetikus fázisába. Ezen javító mechanizmusok azonban nem tudják az összes hibát javítani, így a fennmaradó léziók a sejtciklus S fázisában a replikációs villák előrehaladását megakadályozzák. A befejezetlen replikáció genomikus instabilitáshoz illetve a sejt halálához vezet, amelynek elkerülése érdekében az evolúció során kialakultak olyan DNS hibajavító rendszerek, amelyek segítségével a sérült DNS szakaszok is átírásra kerülhetnek.

Élesztővel végzett kutatások azonosították a DNS-hiba átírásban szerepet játszó legfőbb géneket. Ezen kutatások alapján a károsodott DNS replikációja elsősorban egy Rad5 fehérje függő, a replikációs villa megfordításán alapuló úgynevezett *copy choice* mechanizmus segítségével történik. Emellett egyéb átírást biztosító rendszerek is működnek, amelyek során specializálódott DNS polimerázok, a TLS (*Translesion Synthesis*) polimerázok (pl. RAD30, REV1, pol ζ) folytatják a DNS szintézist a károsodott szakaszokon. Mindezen folyamatokban a Rad6-Rad18 ubikvitin ligáz enzim komplexnek kulcsfontosságú szerepe van; mind a Rad5 fehérje függő mind a TLS polimeráz függő útvonalakat szabályozza.

Az élesztőben azonosított, DNS hiba átírásban résztvevő fehérjék erősen konzerváltak az eukarióták között, számosak már a humán megfelelőjét is azonosították. Kivételt képez a Rad5, amelynek humán homológja munkánk kezdetekor még azonosításra várt. Emberben, az élesztő TLS polimeráz η homológjának hibája egy rákos betegséget, a *Xeroderma Pigmentosum Variáns (XP-V)* formáját okozza. Feltételezhető, hogy a Rad5 emberi megfelelőjének elvesztése is súlyos következményekkel, daganatképződéssel vagy apoptózissal jár, mivel élesztőben a replikációs villa blokkját okozó hibák javításában elsősorban a Rad5 fehérje vesz részt, míg a polimeráz η és a többi TLS polimeráz szerepe lényegesen kisebb.

Munkám célja az élesztő Rad5 fehérje humán homológjának azonosítása, annak vizsgálata, hogy a Rad5-függő DNS hiba átirási útvonal emberben is megtalálható-e. Illetve a Rad5 homológok segítségével a károsodott DNS replikációjának tanulmányozása emberben.

A Rad5 humán homológjainak azonosítását szekvencia adatbázisok szűrésével kezdtük, az élesztő Rad5 fehérje aminosav szekvenciáját használva a szűrés alapjául. Két emberi fehérjét a HLTF-et és az SHPRH-t azonosítottuk, amelyek aminosav szekvenciája, domén szerkezete nagy hasonlóságot mutatott Rad5-ével. Mindkettőben megtalálható a Rad5-re jellemző, SWI/SNF családhoz tartozó, hét motívumból álló helikáz domén és a harmadik és negyedik helikáz domén közé ékelődött RING finger domén. A HLTF és a Rad5 N-terminálisán található egy szekvencia elem a HIRAN domén, amely az SHPRH-ban nincs jelen, funkciója jelenleg ismeretlen, predikciók DNS hiba felismerő, DNS kötő aktivitást társítanak hozzá. Az SHPRH N-terminálisát két motívum, a hiszton linker fehérjékre jellemző H15 és egy PHD domén gazdagítja, amelyek sem a Rad5-ben, sem a HLTF-ben nem találhatók meg.

A HLTF mRNS-éről két, az N-terminális régióban különböző fehérje termék keletkezik emberi sejtekben. A 123. pozícióban található egy metionin, amely egy alternatív transzlációs start kodonként funkcionál, amely egy rövidebb 886 aminosavas fehérjét eredményez a teljes hosszúságú, 1009 aminosavas fehérjével szemben. A rövid izoformából a HIRAN domén hiányzik. Bizonyított, hogy ezen izoforma transzkripciós faktorként specifikus promóter régiókhoz kötődve fehérjék transzkripcióját aktiválja. Példa erre a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAL-1) fehérje, amely promóterének B box eleméhez kötődve annak transzkripcióját serkenti. Ezzel szemben a HLTF hosszú izoformájáról, mely a HIRAN domént tartalmazza, nem mutattak ki transzkripciós faktor aktivitást.

A funkcionális homológia ellenőrzésére irányuló kísérletekben először megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH képes-e menekíteni vagy enyhíteni az élesztő *rad5* deléciós mutáns UV érzékenységi fenotípusát. A HLTF és az SHPRH cDNS-ét élesztő expressziós vektorokba klónoztuk különböző expressziós szintet biztosító promóterek mögé. Az elkészült plazmidokat *rad5* deléciós mutánsba transzformáltuk, a transzformánsok UV érzékenységét összehasonlítottuk a *rad5* deléciós és a vad típusú élesztő törzsek UV érzékenységével. A HLTF esetében nagyon enyhe komplementációt láttunk, míg az SHPRH nem enyhített a *rad5* deléciós törzs UV érzékenységi fenotípusán. Annak érdekében, hogy a HLTF, esetleg az SHPRH hatását jobban láthatóvá tegyük tovább érzékenyítettük a kísérletet *rad30rad5* deléciós mutáns

alkalmazásával *rad5* egyes mutáns helyett. Ezen az érzékenyített háttéren a HLTF UV érzékenységet komplementáló hatása egyértelműen detektálható volt, feljavítva a *rad30rad5* kettős mutáns UV érzékenységét *rad30*-éig. Az SHPRH-val nem figyeltünk meg komplementációt *rad30rad5* háttéren sem.

Megvizsgáltuk, hogy a HLTF és az SHPRH kölcsönhatásba lépnek-e a Rad5 fehérje ismert interakciós partnereinek humán homológjaival. A Rad5 kölcsönhatásba lép a Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13 ubikvitin ligáz komplexekkel, a PCNA-vel. Az interakciók ellenőrzését GST pull down-nal, koimmunoprecipitációs kísérleti rendszerekkel végeztük. Interakciót mutattunk ki a HLTF és a hPCNA, a HLTF és a hRad18, a HLTF és a hUbc13-hMms2 között illetve az SHPRH és a hUbc13-hMms2 között. Ezen interakciók megléte megerősítik azon feltételezésünket, hogy a HLTF, az SHPRH és a Rad5 funkcionális homológok.

Élesztőben DNS-károsodás hatására a Rad18 monoubiquitilálja a PCNA-t, amely monoubikvitinre a Rad5 az Mms2-Ubc13 komplex-szel együttműködve poliubikvitin láncot épít. *In vivo* és *in vitro* kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a HLTF stimulálja-e a PCNA poliubiquitilálását. Eredményeink szerint humán sejtekben az Mms2-Ubc13 és a Rad18 overexpressziója stimulálja a PCNA poliubiquitilálását, amelyet a HLTF tovább fokoz, arra utalva, hogy a HLTF Rad18-al és Ubc13/Mms2-vel együttműködve a Rad5-höz hasonló ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik. A HLTF-ről és az SHPRH-ról *in vivo* kísérletekben kimutattuk, hogy a Rad6-Rad18-al és Mms2-Ubc13-mal együttműködve poliubiquitilálja a PCNA-t.

A HLTF-et először transzkripciós faktorként azonosították, azonban csoportunk eredményei szerint a HLTF részt vesz a károsodott DNS replikációjában is. Ennek bizonyítására a DNS fiber módszert használtuk, amely segítségével a replikációs villák láthatóvá tehetőek. Megfigyeltük, hogy a HLTF siRNS-el való csendesítése következtében a DNS károsodás hatására megállt replikációs villák újraindulása gátolt, hosszabb időt vesz igénybe, mint a HLTF megfelelő expressziója esetén, a károsodás ellenére továbbhaladó villák átlagsebessége lecsökken, az eredeti sebesség helyreállása hosszabb időt vesz igénybe.

Ezen eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a HLTF és az SHPRH strukturális és funkcionális homológjai az élesztő Rad5 DNS hiba átíró fehérjének illetve, hogy a Rad5 képviselte DNS hiba átíró útvonal erősen konzervált, emberben is megtalálható. A

csoportunkban folyó jövőbeni kutatások e fehérjék károsodott DNS replikációjában betöltött pontos szerepének tisztázására irányulnak majd.

10 Summary of the PhD thesis (Angol nyelvű összefoglaló)

Genetic and biochemical studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been instrumental in yielding an understanding of the pathways and mechanisms that eukaryotic cells employ to rescue the replication fork stalled at DNA lesion sites. Unless rescued in a timely and orderly fashion, the stalling of replication can lead to DNA strand breaks and result in chromosome rearrangements and enhanced rates of carcinogenesis. The Rad6–Rad18 ubiquitin-conjugating complex of yeast governs at least three alternative pathways that promote replication through DNA lesions: DNA polymerase Pol η , Pol ζ and Rev1 dependent translesion synthesis (TLS), and an Mms2–Ubc13–Rad5 dependent error-free postreplicational repair (PRR) pathway. Pol η , for example, promotes efficient and relatively error-free synthesis through UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers; consequently, inactivation of Pol η in both yeast and humans confers enhanced UV mutagenesis and in humans causes the variant form of Xeroderma Pigmentosum (XP-V), a cancer-prone syndrome. The Mms2–Ubc13–Rad5-dependent pathway promotes the repair of discontinuities that form in the newly synthesized strand opposite from DNA lesions. Although the mechanism by which the Rad5 pathway operates is not well known, it likely utilizes a template switching mechanism, wherein the newly synthesized daughter strand of the undamaged complementary sequence is used as the template for bypassing the lesion. Rad5, a member of the SWI/SNF family of ATPases, exhibits a DNA-dependent ATPase activity, and it also has a C3HC4 RING motif, characteristic of ubiquitin ligases. Ubiquitin ligases promote the protein ubiquitylation reaction by binding the cognate ubiquitin-conjugating (UBC) enzyme as well as the protein substrate and by positioning them optimally for efficient ubiquitin conjugation to occur. Rad5 physically associates with the Mms2–Ubc13 complex via Ubc13, and it also interacts with the Rad18 subunit of the Rad6–Rad18 complex. Both the ATPase and ubiquitin ligase activities of Rad5 are essential for PRR, as the repair of discontinuities formed in the newly synthesized DNA in UV irradiated cells becomes as highly impaired in the *rad5* mutants defective in either of these functions as in the *rad5* mutant. In DNA damaged yeast cells, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) becomes monoubiquitylated by Rad6–Rad18; subsequently, this lysine residue is polyubiquitylated via in an Mms2–Ubc13–Rad5- dependent manner. Although the biochemical evidence is lacking, genetic evidence in

yeast is consistent with a role of Rad5 acting as a ubiquitin ligase in Mms2–Ubc13-dependent polyubiquitylation of PCNA. All three Rad6–Rad18 dependent lesion bypass pathways are rendered inactive in the absence of PCNA ubiquitylation. Monoubiquitylation of PCNA is necessary for TLS by Pol η , Pol ζ and Rev1, and polyubiquitylated PCNA activates the Rad5-dependent PRR pathway. PCNA polyubiquitylation is a necessary prerequisite for the activation of this PRR pathway.

The various elements of the Rad6–Rad18 pathway have been conserved in higher eukaryotes, including in humans. Also, similar to that in yeast, PCNA is monoubiquitylated and then polyubiquitylated in response to treatment with DNA damaging agents. Although for humans the various TLS polymerases that promote lesion bypass in a Rad6–Rad18-dependent manner have been described and the Mms2–Ubc13 complex has been identified, the evidence for a Rad5 counterpart has been lacking thus far.

Our goals were to elucidate whether a homologue yeast Rad5-like damage-bypass system operates in human cells, and to understand how human cells replicate damaged DNA with the following experimental approaches:

1. Complementation studies

We tested whether HLTF and SHPRH could complement the UV and RTG sensitivity of yeast strains devoid of Rad5 function.

2. Interaction studies

We examined whether HLTF and SHPRH could associate *in vivo* and *in vitro* with Rad6–Rad18, Mms2–Ubc13, and PCNA.

3. Stimulation of the polyubiquitination of PCNA

We examined whether HLTF and SHPRH could stimulate the polyubiquitination of PCNA *in vivo* and *in vitro*.

4. DNA fiber studies

We investigated if HLTF has a role in the replication of damaged DNA

We have provided biochemical *in vivo* evidences, that two putative human tumor suppressor proteins, HLTF and SHPRH are functional homologues of yeast Rad5 and that they act as a ubiquitin ligase for promoting Mms2–Ubc13-dependent polyubiquitylation of PCNA. HLTF and Rad5 share the same unique structural features, including a RING domain embedded

within a SWI/SNF helicase domain and an HIRAN domain, while SHPRH resembles the unique structure of a RING domain embedded into a SWI/SNF helicase domain but it lacks the HIRAN domain and bears two additional, the H15 and PHD finger domains. We found that HLTF complements the UV sensitivity of a *rad5* deletion yeast strain. Also, similar to Rad5, both HLTF and SHPRH physically interacts with the hRad6–hRad18 and hMms2–hUbc13 ubiquitin-conjugating enzyme complexes and promotes polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen *in vivo* and *in vitro*. Based on DNS fiber method we found that *in vivo*, in the absence of HLTF, upon MMS treatment a significant amount of the replication forks are blocked and also the recovery of the replication fork activity is impaired suggesting a role for HLTF in the recovery from DNA damage stress.

Taken together, our observations that human HLTF and SHPRH functions together with Rad6–Rad18 and Mms2-Ubc13 in PCNA polyubiquitination, and that HLTF can complement the UV sensitivity of *rad5* delta yeast cells, strongly support a role for HLTF and SHPRH in promoting error-free DNA damage bypass. Hence, by preventing mutagenesis, HLTF and SHPRH DNA repair function would contribute to minimizing the incidence of carcinogenesis in humans.

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Haracska Lajosnak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette csoportjában Ph.D. munkám elvégzését. Dr. Fátyol Károlynak a koimmunoprecipitációs, Dr. Unk Ildikónak a GST pull down kísérletek elvégzéséért. Köszönöm Dr. Satya és Louise Prakashnak, Rad5 mutáns élesztőtörzsek rendelkezésünkre bocsátását, illetve a hogy elvégezhattük a komplementációs kísérleteket laboratóriumukban. Köszönöm Apolinar Maya Mendoza-nak, Dean Alan Jackson-nak a DNS fiber módszer megtanítását. Köszönettel tartozom Blastyák Andrásnak és a laboratórium minden tagjának a munkám során nyújtott hasznos ötleteikért, tanácsaikért. Illésné Kovács Katalinnak, Kraviár Ildikónak, Nótári Péterné Ilonának az aszisztenciáért. Szakál Barnabásnak, Szukacsov Valériának, Juhász Szilviának a Ph.D dolgozat elkészítése során nyújtott tanácsaikért, kritikai bírálatukért.

12 Referenciák

1. Lodish, H. et al. *Molecular Cell Biology*. 1184 (W. H. Freeman: 1999).
2. Sancar, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39-85 (2004).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
4. Pagès, V. & Fuchs, R.P.P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* **21**, 8957-66 (2002).
5. Kelner, A. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **35**, 73-9 (1949).
6. Dulbecco, R. Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature* **163**, 949(1949).
7. Kelner, A. A Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia Coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet induced mutation. *J Bacteriol* **58**, 511-22 (1949).
8. Friedberg, S.E.C., Walker, G.C. & Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*.
9. Boyce, R.P. & Howard-Flanders, P. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E.coli*-K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 293-300 (1964).
10. Setlow, R.B. & Carrier, W.L. The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 226-31 (1964).
11. Howard-Flanders, P. et al. A genetic locus in *E. coli* K12 that controls the reactivation of UV-photoproducts associated with thymine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 2109-15(1962).
12. Pettijohn, D. & Hanawalt, P. Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *J Mol Biol* **9**, 395-410 (1964).
13. Rasmussen, R.E. & Painter, R.B. Evidence for repair of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells. *Nature* **203**, 1360-2 (1964).
14. Lindahl, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3649-53 (1974).

15. Cleaver, J.E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652-6 (1968).
16. Haberman, A., Heywood, J. & Meselson, M. DNA modification methylase activity of *Escherichia coli* restriction endonucleases K and P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3138-41 (1972).
17. Lu, A.L., Clark, S. & Modrich, P. Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4639-43 (1983).
18. Gazzoli, I. et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* **62**, 3925-8 (2002).
19. Dunlop, M.G. et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* **6**, 105-10 (1997).
20. Modrich, P. Mechanisms in Eukaryotic Mismatch Repair. *J. Biol. Chem.* **281**, 30305-30309 (2006).
21. Sweder, K.S. et al. DNA repair deficiencies associated with mutations in genes encoding subunits of transcription initiation factor TFIIF in yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 1540-6 (1996).
22. Hanawalt, P.C. Preferential repair of damage in actively transcribed DNA sequences in vivo. *Genome* **31**, 605-11 (1989).
23. Venema, J. et al. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4707-11 (1990).
24. Matsumoto, Y. et al. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* **274**, 33703-8 (1999).
25. Wood, R.D. et al. Nucleotide excision repair of DNA by mammalian cell extracts and purified proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 625-32 (1993).
26. Setlow, R.B., Swenson, P.A. & Carrier, W.L. Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells. *Science* **142**, 1464-6 (1963).
27. BOLLUM, F.J. & SETLOW, R.B. Ultraviolet inactivation of DNA primer activity. I. Effects of different wavelengths and doses. *Biochim Biophys Acta* **68**, 599-607 (1963).

28. Friedberg, E.C. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 943-53 (2005).
29. McGrath, R.A. & Williams, R.W. Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. *Nature* **212**, 534-5 (1966).
30. Rupp, W.D. & Howard-Flanders, P. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. *J Mol Biol* **31**, 291-304 (1968).
31. Iyer, V.N. & Rupp, W.D. Usefulness of benzoylated naphthoylated DEAE-cellulose to distinguish and fractionate double-stranded DNA bearing different extents of single-stranded regions. *Biochim Biophys Acta* **228**, 117-26 (1971).
32. Bridges, B.A. Error-prone DNA repair and translesion synthesis: focus on the replication fork. *DNA Repair (Amst)* **4**, 618-9, 634 (2005).
33. *Molecular and environmental aspects of mutagenesis*. 289 (Thomas: 1974).
34. Witkin, E.M. Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. *Annu Rev Microbiol* **23**, 487-514(1969).
35. Echols, H. & Goodman, M.F. Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511 (1991).
36. Echols, H. & Goodman, M.F. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. *Mutat Res* **236**, 301-11
37. Rajagopalan, M. et al. Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD', and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10777-81 (1992).
38. Tang, M. et al. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8919-24 (1999).
39. Reuven, N.B. et al. The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem* **274**, 31763-6 (1999).
40. Wagner, J. et al. The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell* **4**, 281-6 (1999).
41. Friedberg, E.C. & Gerlach, V.L. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell* **98**, 413-6 (1999).

42. Fujiwara, Y. & Tatsumi, M. Replicative bypass repair of ultraviolet damage to DNA of mammalian cells: caffeine sensitive and caffeine resistant mechanisms. *Mutat Res* **37**, 91-110 (1976).
43. Higgins, N.P., Kato, K. & Strauss, B. A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* **101**, 417-25 (1976).
44. Andersen, P.L., Xu, F. & Xiao, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* **18**, 162-173 (2008).
45. Niimi, A. et al. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008).
46. Lehmann, A.R. et al. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* **6**, 891-9 (2007).
47. Friedberg, E.C., Lehmann, A.R. & Fuchs, R.P.P. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**, 499-505 (2005).
48. Ohmori, H. et al. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* **8**, 7-8 (2001).
49. Lehmann, A.R. Replication of damaged DNA in mammalian cells: new solutions to an old problem. *Mutat Res* **509**, 23-34 (2002).
50. Hubscher, U., Maga, G. & Spadari, S. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**, 133-63 (2002).
51. Tissier, A. et al. poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev.* **14**, 1642-1650 (2000).
52. Friedberg, E.C., Wagner, R. & Radman, M. Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations. *Science* **296**, 1627-1630 (2002).
53. Johnson, R.E. et al. Eukaryotic polymerases [iota] and [zeta] act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* **406**, 1015-1019 (2000).
54. Nelson, J.R., Lawrence, C.W. & Hinkle, D.C. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* **382**, 729-731 (1996).
55. Masutani, C. et al. Xeroderma pigmentosum variant: from a human genetic disorder to a novel DNA polymerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 71-80 (2000).
56. Masutani, C. et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J* **18**, 3491-501 (1999).

57. Haracska, L. et al. Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **24**, 4267-74 (2004).
58. Zhang H, Lawrence CW. The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(44):15954-9 (2005).
59. Berdichevsky, A., Izhar, L. & Livneh, Z. Error-free recombinational repair predominates over mutagenic translesion replication in *E. coli*. *Mol Cell* **10**, 917-24 (2002).
60. Postow, L. et al. Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem* **276**, 2790-6 (2001).
61. Xiao, W. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* **155**, 1633-41 (2000).
62. Peters, S.J., Harris, J.R. & Finley, D. *Ubiquitin and the biology of the cell*.
63. Hershko, A. et al. Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7021-5 (1984).
64. Reiss, Y., Heller, H. & Hershko, A. Binding sites of ubiquitin-protein ligase. Binding of ubiquitin-protein conjugates and of ubiquitin-carrier protein. *J Biol Chem* **264**, 10378-83 (1989).
65. Hershko, A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* **12**, 1191-7 (2005).
66. Li, W. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2397-406 (2008).
67. Tan, J.M.M. et al. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **17**, 431-9 (2008).
68. Gohda, J. et al. HTLV-1 Tax-induced NFkappaB activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 225-30 (2007).
69. Brun, J. et al. hMMS2 serves a redundant role in human PCNA polyubiquitination. *BMC Mol Biol* **9**, 24 (2008).
70. Majka, J. & Burgers, P.M.J. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**, 227-60 (2004).

71. Kelman, Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-40 (1997).
72. Krishna, T.S. et al. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**, 1233-43 (1994).
73. Lee, K. & Myung, K. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells* **26**, 5-11 (2008).
74. Andersen, P.L., Xu, F. & Xiao, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* **18**, 162-73 (2008).
75. Prakash, L. The structure and function of RAD6 and RAD18 DNA repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome* **31**, 597-600 (1989).
76. Koken, M.H. et al. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8865-9 (1991).
77. Bailly, V. et al. Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* **272**, 23360-5 (1997).
78. Bailly, V. et al. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev* **8**, 811-20 (1994).
79. Bailly, V., Prakash, S. & Prakash, L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. *Mol Cell Biol* **17**, 4536-43 (1997).
80. Braithwaite, D.K. & Ito, J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **21**, 787-802 (1993).
81. Kunkel, T.A. & Bebenek, K. DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**, 497-529 (2000).
82. Lehmann, A.R. Replication of UV-damaged DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. *Gene* **253**, 1-12 (2000).
83. Goodman, M.F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**, 17-50 (2002).
84. Haracska, L., Prakash, L. & Prakash, S. A mechanism for the exclusion of low-fidelity human Y-family DNA polymerases from base excision repair. *Genes Dev.* **17**, 2777-2785 (2003).

85. Torres-Ramos, C.A., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**, 2419-26 (2002).
86. Hofmann, R.M. & Pickart, C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**, 645-53 (1999).
87. VanDemark, A.P. et al. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* **105**, 711-20 (2001).
88. Moraes, T.F. et al. Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat Struct Biol* **8**, 669-73 (2001).
89. Johnson, R.E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol* **12**, 3807-18 (1992).
90. Johnson, R.E., Prakash, S. & Prakash, L. Yeast DNA repair protein RAD5 that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **269**, 28259-62 (1994).
91. Blastyák, A. et al. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell* **28**, 167-75 (2007).
92. Prakash, L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol Gen Genet* **184**, 471-8 (1981).
93. di Caprio, L. & Cox, B.S. DNA synthesis in UV-irradiated yeast. *Mutat Res* **82**, 69-85 (1981).
94. Resnick, M.A., Boyce, J. & Cox, B. Postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **146**, 285-90 (1981).
95. Hoege, C. et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41 (2002).
96. Zhuang, Z. et al. Regulation of polymerase exchange between Pol ϵ and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5361-6 (2008).
97. Chiu, R.K. et al. Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet* **2**, e116 (2006).

98. Gangavarapu, V. et al. Mms2-Ubc13-Dependent and -Independent Roles of Rad5 Ubiquitin Ligase in Postreplication Repair and Translesion DNA Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7783-7790 (2006).
99. Garg, P. & Burgers, P.M. Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18361-6 (2005).
100. Stelter, P. & Ulrich, H.D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188-91 (2003).
101. Frampton, J. et al. Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **17**, 2976-85 (2006).
102. Ulrich, H.D. & Jentsch, S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* **19**, 3388-97 (2000).
103. Ulrich, H.D. Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J Biol Chem* **278**, 7051-8 (2003).
104. Ulrich, H.D. Conservation of DNA damage tolerance pathways from yeast to humans. *Biochem Soc Trans* **35**, 1334-7 (2007).
105. Cordonnier, A.M., Lehmann, A.R. & Fuchs, R.P. Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol Cell Biol* **19**, 2206-11 (1999).
106. Masutani, C. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* **399**, 700-4 (1999).
107. Ding, H. et al. Functional interactions between Sp1 or Sp3 and the helicase-like transcription factor mediate basal expression from the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Biol Chem* **274**, 19573-80 (1999).
108. Ding, H. et al. Characterization of a helicase-like transcription factor involved in the expression of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *DNA Cell Biol* **15**, 429-42 (1996).
109. Mahajan, M.C. & Weissman, S.M. DNA-dependent adenosine triphosphatase (helicase-like transcription factor) activates beta-globin transcription in K562 cells. *Blood* **99**, 348-56 (2002).

110. Sood, R. et al. Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region. *Genomics* **82**, 153-61 (2003).
111. Kikuno, R. et al. HUGE: a database for human large proteins identified in the Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res* **28**, 331-2 (2000).
112. Kikuno, R. et al. HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE. *Nucleic Acids Res* **32**, D502-4 (2004).
113. Bannasch, D. et al. LIFEdb: a database for functional genomics experiments integrating information from external sources, and serving as a sample tracking system. *Nucleic Acids Res* **32**, D505-8 (2004).
114. Unk, I. et al. Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18107-12 (2006).
115. Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-22 (1995).
116. Russell, P. & Nurse, P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-53 (1986).
117. Johnson, R.E. et al. Yeast DNA polymerase zeta (zeta) is essential for error-free replication past thymine glycol. *Genes Dev* **17**, 77-87 (2003).
118. Turner, D.L. & Weintraub, H. Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* **8**, 1434-47 (1994).
119. Cai, J. et al. Reconstitution of human replication factor C from its five subunits in baculovirus-infected insect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12896-901 (1996).
120. Gietz, D. et al. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425 (1992).
121. Jackson, D.A. & Pombo, A. Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells. *J Cell Biol.* **140**, 1285–1295 (1998).
122. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-90 (1988).

123. Iyer, L.M., Babu, M.M. & Aravind, L. The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle* **5**, 775-82 (2006).
124. Hibi, K. et al. Methylation pattern of HLTF gene in digestive tract cancers. *Int J Cancer* **104**, 433-6 (2003).
125. Chen, S. et al. The RING finger ATPase Rad5p of *Saccharomyces cerevisiae* contributes to DNA double-strand break repair in a ubiquitin-independent manner. *Nucleic Acids Res* **33**, 5878-86 (2005).
126. Doe, C.L. et al. Cloning and characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rad8 gene, a member of the SNF2 helicase family. *Nucleic Acids Res* **21**, 5964-71 (1993).
127. Vikis, H.G. & Guan, K. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **261**, 175-86 (2004).
128. Friedberg, E.C. Reversible monoubiquitination of PCNA: A novel slant on regulating translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **22**, 150-2 (2006).
129. Motegi, A. et al. Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol* **175**, 703-8 (2006).
130. Xiao, W. et al. The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3908–3914 (1998).
131. Tateishi S, Sakuraba Y, Masuyama S, Inoue H, Yamaizumi M. Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(14):7927-32. (2000)
132. Motegi, A. et al. Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12411-6 (2008).
133. Li, Z. et al. Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV- induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4459-64 (2002).
134. Prakash, S., Johnson, R.E. & Prakash, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* **74**, 317-53 (2005).
135. Sheridan, P.L. et al. Cloning of an SNF2/SWI2-related protein that binds specifically to the SPH motifs of the SV40 enhancer and to the HIV-1 promoter. *J Biol Chem* **270**, 4575-87 (1995).

136. Hamai, Y. et al. DNA hypermethylation and histone hypoacetylation of the HMTF gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Cancer Sci* **94**, 692-8 (2003).
137. Leung, W.K. et al. Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Mol Carcinog* **37**, 91-7 (2003).
138. Moinova, H.R. et al. HMTF gene silencing in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4562-7 (2002).
139. Kim, H. & Chen, J. New players in the BRCA1-mediated DNA damage responsive pathway. *Mol Cells* **25**, 457-61 (2008).